

- 1 -

明細書

有用タンパク質のスクリーニング方法

5 技術分野

本発明は、ランダムな架橋を利用した有用なタンパク質のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られるタンパク質などに関する。

背景技術

10 タンパク質の構造解析から有用な機能を持つタンパク質をデザインするという発想に基づくタンパク質工学は、長年の努力にも関わらず目立った成果を挙げることが困難であった。そこで、進化の原理を応用した分子デザインの方法である「進化分子工学」(Eigen, E. & Gardiner, W., Pure & Appl. Chem., 56, 967-978 参照)の概念が 1984 年に Eigen らによって提案された。これは様々な変異体集団
15 (ライブラリー)、つまり様々な構造をもつ分子集団から、目的の機能をもった分子を選択する技術の開発を意味する。1990 年代に入り「*In vitro* evolution (試験管内進化法)」と呼ばれる一連の研究により具体的な成果が現れ、取得された機能分子も RNA、DNA、タンパク質、ペプチドと多岐にわたっている。

核酸 (RNA と DNA) のスクリーニング法としては、*In vitro* selection 法 (Ellington, A. D. & Szostak, J. W., Nature, 346, 818-822 (1990) 参照) や SELEX 法 (Tuerk, C. & Gold, L., Science, 249, 505-510 (1990) 参照)、また、ペプチド、タンパク質のスクリーニング法としては、ファージディスプレイ法 (Scott, J. K. & Smith, G. D., Science, 249, 386-390 (1990) 参照)、基板上に様々な配列のペプチドを光マスク法と光反応を用いて固相合成していくフォトリソグラフィー法 (Fodor, S. P., et al., Science, 251, 767-773 (1991) 参照)、また、無細胞翻訳系を用いたものとしてリボソームディスプレイ法 (Mattheakis, L. C. et al., Proc.

- 2 -

Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9022-9026 参照) が知られている。

また、ピューロマイシンの特異的性質を利用した *in vitro virus* 法 (Nemoto et al., FEBS Lett. 414, 405 (1997) ; Tabuchi et al., FEBS Lett. 508, 309 (2001) 等参照) を用いてペプチドやタンパク質をスクリーニングする方法も開発さ
れています (W001/016600号公報参照)。

ペプチドやタンパク質のスクリーニング法では、大量に効率的にスクリーニングする上で、また、様々なタンパク質が合成できる点において無細胞翻訳系を用いるリボソームディスプレイ法や *In vitro virus* 法が優れている。一方、タンパク合成はいわゆる液相中で行われるため、タンパク質が機能を発現するために必須なフォールディングが必ずしも容易ではない。例えば、タンパク質にシステインを多く含むペプチドやタンパク質は分子間で S-S 結合を形成し、個々のタンパク質がフォールディングできない問題がある。

一方、タンパク質の機能は、専らその立体構造に依存する。すなわち、タンパク質がフォールドすることによって、ある部位が特定の構造を有し、その部位が受容体、酵素などと結合し、その受容体又は酵素を活性化又は不活性化することによって何らかの生理的機能を発現する。タンパク質の立体構造の解析は、現在盛んに行われているが、立体構造の解析は簡単なものではない。例えば、解析の対象となるタンパク質を NMR あるいは X 線回折によって解析できる程度までに大量に調製することは困難である。また、X 線回折に供するためには、タンパク質を結晶化することが必須であるが、この結晶化も容易ではないからである。

発明の開示

このように、現在では、多くの労力が生体内で発現するタンパク質の立体構造解析とその機能解析に注がれている。しかしながら、上述のように、立体構造解析は困難であるから、人工合成によって得られる種々の立体構造を有するタンパク質から特定の機能を有するタンパク質を効率良く、かつ容易にスクリーニング

- 3 -

できる手法が確立されることが望ましい。

また、タンパク質のスクリーニングあるいはタンパク質の機能解析において、
タンパク質のフォールディングは極めて重要であるが上述のように合成途中で分子間の相互作用が生じるために困難である。タンパク質を確実にフォールディン

5 グさせた後にスクリーニングや機能解析をする手法を確立することが望ましい。

また、そのようにして取得されたタンパク質の構造を改変してより高い活性を有するタンパク質を設計する手法が確立されることが望ましい。

上記の事情に鑑み本発明者らは、人工合成によって得られる種々の立体構造を

有するタンパク質から特定の機能を有するタンパク質を効率良く、かつ容易にス

10 クリーニングできる方法の提供を課題とする。

本発明者らは、システイン残基をランダムにアミノ酸配列中に導入することによって、ジスルフィド結合 (S-S 結合) をランダムに有するタンパク質群（ランダムライブラリー）を合成し、その機能を解析することにより、有用タンパク質をスクリーニング可能な方法の開発を行った。

15 まず本発明者らは、システイン残基を有するタンパク質をコードする核酸分子 (mRNA) と、該 mRNA の翻訳産物であるタンパク質との連結部としての役割を担うピューロマイシンとの連結体が、固相に固定された構造からなる「固定化 mRNA—ピューロマイシン連結体」の作製を行った。次いで、該連結体を翻訳系へ供することにより、該 mRNA の翻訳産物であるタンパク質がさらに連結されたランダムライブラリーを作製した。上記方法においては、固定化された mRNA—ピューロマイシン連結体を翻訳系と接触させることにより、固相上においてタンパク質を効率的に合成させることが可能である。合成されたタンパク質は、ピューロマイシンを介して固相に固定される。

さらに本発明者らは、上記固定化ランダムライブラリーを、逆転写反応系へ供
25 することにより、該ライブラリーにおける mRNA の逆転写産物である相補的 DNA
が連結されたランダムライブラリーを構築した。通常、RNA に比べて DNA はより

- 4 -

安定であることから、タンパク質相互作用解析等の機能解析において、被検分子と接触させる際に、上記ライプラリーは非常に有用である。

次いで本発明者らは、上記ライプラリーをペプチド酸化反応へ供することにより、該ライプラリーのタンパク質について、1以上のS-S結合を形成させ、タンパク質をフォールディングさせることに成功した。これにより、立体構造を形成し実際に機能を発現するタンパク質を、効率的にスクリーニングすることが可能となった。

続いて、フォールディングされたランダムライプラリーを、標的分子と接触させ、各ライプラリーに含まれるタンパク質の機能（例えば、標的分子との結合活性等）を解析し、所望の機能を有するタンパク質を選択することにより、有用タンパク質のスクリーニングを行うことができる。

本発明においては、例えば、ある標的分子に対して少しでも結合活性を有するタンパク質を取得できた場合、そのタンパク質のアミノ酸配列をランダムあるいは計画的に改変して、より活性の強いタンパク質を取得することが可能である。

即ち、改変されたタンパク質をコードするmRNAを含む、前述の「固定化mRNA-ピューロマイシン連結体」を作製し、次いで、上述の方法を適宜、複数回繰り返すことにより、標的分子との結合活性が増強されたタンパク質を取得することができる。

本発明者らは、本発明の上記方法が、実際に実施し得ることを実証するために、
20 標的分子としてCy3を選択し、該Cy3と結合活性を有する機能タンパク質のスクリーニングを行った。

その結果、実際にCy3と結合活性を有する複数のタンパク質を取得することに成功した。即ち、本発明の方法は実際に実施し得る有用な方法であることが明確に示された。

25 本発明は、人工合成によって得られる種々の立体構造を有するタンパク質から特定の機能を有するタンパク質を効率良く、かつ容易にスクリーニングできる方

法に関し、より具体的には、次に示すような、有用なタンパク質のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られるタンパク質等を提供する。

(1) システイン残基をランダムにアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合をランダムに有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法

5 の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも 2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする mRNA を 1 以上調製し、得られた mRNA のそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結して mRNA-ピューロマイシン連結体（群）を得る工程；

(b) 工程 (a) で得られた mRNA-ピューロマイシン連結体（群）と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）を調製する工程；及び

(c) 工程 (b) において調製された mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）と 1 以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；

10 を含む上記スクリーニング方法。

(2) 前記 mRNA-ピューロマイシン連結体が、mRNA の 3' 末端にスペーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物を連結したものである前記 (1) に記載の方法。

(3) 工程 (a) において、前記 mRNA が、2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする DNA から転写されることによって調製される、前記 (1) 又は (2) に記載の方法。

25 (4) 工程 (b) において用いられる翻訳系が無細胞翻訳系である、前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の方法。

(5) 工程 (c) において、前記タンパク質と前記標的物質とが相互作用しているか否かの判定が、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法又はアフィニティーピーズ法によって両者が結合しているか否かを判断することによって行われる、前記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の方法。

5 (6) 工程 (c) において相互作用していると判断されたタンパク質及び／又は標的物質を同定する工程をさらに含む、前記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法。

(7) 工程 (c) に続いて、さらに、(d) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含む mRNA—ピューロマイシン—タンパク質連結体（群）の mRNA 10 A から逆転写により DNA を調製し、さらにその DNA に変異を導入することによって改変された配列を有する mRNA を調製し、この mRNA を工程 (a) に供することによって、標的物質との相互作用力を強化したタンパク質を取得する、前記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の方法。

15 (8) 前記 DNA の変異が Error-Prone PCR によって行われる、前記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法。

(9) 工程 (a) ~ (d) を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力を強化したタンパク質を取得する、前記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の方法。

20 (10) 前記 mRNA が、8~500 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記 (1) ~ (9) のいずれかに記載の方法。

(11) 前記 mRNA が、10~200 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記 (1) ~ (10) のいずれかに記載の方法。

(12) 前記 mRNA が、4~10 個のシステイン残基を有するタンパク質をコードするものである、前記 (1) ~ (11) のいずれかに記載の方法。

25 (13) 前記 mRNA が、隣接するシステイン残基がそれぞれ 2~20 個離れて存在するようにアミノ酸配列中に分散しているタンパク質をコードするも

のである、前記（1）～（12）のいずれかに記載の方法。

(14) 前記mRNAが、最もN末端側に位置するシステイン残基と最もC末端側に位置するシステイン残基が10～50個離れているタンパク質をコードするものである、前記（1）～（13）のいずれかに記載の方法。

5 (15) 前記スペーサーが、ポリヌクレオチド、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリスチレン、ペプチド核酸又はこれらの組合せを主骨格として含むものである、前記（1）～（14）のいずれかに記載の方法。

(16) 前記スペーサーは固相結合部位を有し、前記mRNA-ピューロマイシン連結体が、その固相結合部位を介して固相に結合されている、前記(1)～(15)のいずれかに記載の方法。

(17) 前記固相が、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板、ガラス容器、プラスチック容器及びメンブレンから選択される、前記（1）～（16）のいずれかに記載の方法。

15 (18) 前記スペーサーの固相結合部位は切断可能部位を有しており、工程(b)において固相上でタンパク質を確実にフォールディングさせた後に、その切断可能部位を切断してmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を固相から切り離し、そして切り離されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を工程(c)に供する、前記(1)～(16)又は(17)に記載の方法。

(19) 前記スペーサーがDNAスペーサーであり、前記切断可能部位が制限酵素認識部位である、前記(18)に記載の方法。

(20) 前記(1)～(19)のいずれかの方法によって得られるタンパク質であって、8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

- 8 -

(21) 8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシスティン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

また本発明は、より好ましくは、以下の有用なタンパク質のスクリーニング方法、および該スクリーニング方法によって得られるタンパク質等に関する。
5

[1] システィン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

(a) 少なくとも2以上のシスティン残基を含むタンパク質をコードする
10 RNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体(群)を得る工程；

(b) 工程(a)で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-
15 タンパク質連結体(群)を調製する工程；及び

(c) 工程(b)において調製されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；

20 を含む上記スクリーニング方法。

[2] 工程(c)に続いて、さらに、(d)前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、さらにそのDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記[1]に記載の方法。
25

- 9 -

[3] システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

- (a) 少なくとも 2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする mRNA を 1 以上調製し、得られた mRNA のそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結して mRNA-ピューロマイシン連結体（群）を得る工程；
5
(b) 工程 (a) で得られた mRNA-ピューロマイシン連結体（群）と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-
10
タンパク質連結体（群）を調製する工程；
(c) 工程 (b) で得られた mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体
15
（群）の mRNA から逆転写により DNA を調製し、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体を調製する工程；及び
(d) 工程 (c) において調製された DNA-ピューロマイシン-タンパク質
20
連結体（群）と 1 以上の標的物質とを接触させ、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；
25
を含む上記スクリーニング方法。

[4] 工程 (d) に続いて、さらに、(e) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含む DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）における DNA に変異を導入することによって改変された配列を有する mRNA を調製し、この mRNA を工程 (a) に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記 [3] に記載の方法。

[5] 工程 (a) において、前記 mRNA-ピューロマイシン連結体が、mRNA の 3
25
'末端にスペーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結した構造である前記 [1] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

- 1 0 -

[6] 工程 (a) において、前記 mRNA が、2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする DNA から転写されることによって調製される、前記 [1] ~ [5] のいずれかに記載の方法。

[7] 工程 (b) において用いられる翻訳系が無細胞翻訳系である、前記 [1] ~ [6] のいずれかに記載の方法。

[8] 前記タンパク質と前記標的物質とが相互作用しているか否かの判定が、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法又はアフィニティービーズ法によって両者が結合しているか否かを判断することによって行われる、前記 [1] ~ [7] のいずれかに記載の方法。

10 [9] 相互作用していると判断されたタンパク質及び／又は標的物質を同定する工程をさらに含む、前記 [1] ~ [8] のいずれかに記載の方法。

[10] 前記 DNA の変異が Error-Prone PCR、等の変異導入法によって行われる、前記 [2]、または [4] ~ [9] のいずれかに記載の方法。

15 [11] 前記の各工程を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記 [1] ~ [10] のいずれかに記載の方法。

[12] 前記 mRNA が、8 ~ 500 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記 [1] ~ [11] のいずれかに記載の方法。

20 [13] 前記 mRNA が、10 ~ 200 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記 [1] ~ [12] のいずれかに記載の方法。

[14] 前記 mRNA が、2 ~ 10 個のシステイン残基を有するタンパク質をコードするものである、前記 [1] ~ [13] のいずれかに記載の方法。

25 [15] 前記 mRNA が、隣接するシステイン残基がそれぞれ 2 ~ 20 個離れて存在するようにアミノ酸配列中に分散しているタンパク質をコードするものである、前記 [1] ~ [14] のいずれかに記載の方法。

[16] 前記 mRNA が、最も N 末端側に位置するシステイン残基と最も C 末端側

- 11 -

に位置するシステイン残基が5～50個離れているタンパク質をコードするものである、前記〔1〕～〔15〕のいずれかに記載の方法。

〔17〕 前記スペーサーが、ポリヌクレオチド、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリスチレン、ペプチド核酸又はこれらの組合せを主骨格として含むものである、前記〔5〕～〔16〕のいずれかに記載の方法。

〔18〕 前記スペーサーは固相結合部位を有し、前記mRNA-ピューロマイシン連結体が、その固相結合部位を介して固相に結合されている、前記〔5〕～〔17〕のいずれかに記載の方法。

〔19〕 前記固相が、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セ10 ファロースビーズ、磁性体ビーズ、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板、ガラス容器、プラスチック容器及びメンブレンから選択される、前記〔18〕に記載の方法。

〔20〕 前記スペーサーの固相結合部位が切断可能な部位を有するものであり、固相上でタンパク質をフォールディングさせた後に、前記切断可能部位を切断する工程を含む、前記〔18〕又は〔19〕に記載の方法。

〔21〕 前記スペーサーがDNAスペーサーであり、前記切断可能部位が制限酵素認識部位である、前記〔20〕に記載の方法。

〔22〕 前記〔1〕～〔21〕のいずれかの方法によって得られるタンパク質であって、8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

〔23〕 8～500のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を2～10個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

〔25〕 以下、本発明をその実施態様に基づいて詳細に説明する。

本発明は、システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフ

- 12 -

イド結合をランダムに有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質を特定する方法に関する。

本発明の好ましい態様においては、下記工程（a）～（c）を有する、システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質を特定する方法に関する。

（a）少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA—ピューロマイシン連結体（群）（以下、「mRNA—PM連結体（群）」ともいう）を得る工程；

（b）工程（a）で得られたmRNA—PM連結体（群）と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA—ピューロマイシン—タンパク質連結体（群）（以下、「mRNA—PM—PRT連結体（群）」ともいう）を調製する工程；及び

（c）工程（b）において調製されたmRNA—PM—PRT連結体（群）と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA—PM—PRT連結体（群）中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程。

ここで、「システイン残基をアミノ酸配列中に導入する」とは、好ましくは、あるアミノ酸配列（天然タンパク質由来又は合成配列）に部位無作為的（ランダム）にシステイン残基を導入することをいう。但し本発明においては、アミノ酸配列中に導入されるシステイン残基は、必ずしもランダムに導入される場合に限定されず、例えば、ある規則性に基づいて、または計画的にシステイン残基が配置されるように導入される場合も含まれる。また、「ジスルフィド結合を有するタンパク質」とは、好ましくは、そのタンパク質が部位無作為的（ランダム）にジスルフィド結合を有することをいうが、上記のように必ずしも、ランダムにジスルフィド結合を有することに限定されない。

以下、各工程の詳細について説明する。

1. 工程 (a) : mRNA-ピューロマイシン連結体 (群) の調製

(mRNA の配列設計)

工程 (a) において用いられる mRNA は、取得上および取り扱い上の便宜から、

5 人工的に調製されるものが好ましいが、自然界に存在するものを排除するもので
はない。ここで用いられる mRNA は、少なくとも 1 以上のジスルフィド結合を有
するタンパク質を合成するために、少なくとも 2 以上のシステイン残基を含むタ
ンパク質をコードしている。この mRNA は、好ましくは、2~10 個、より好ま
くは 4~10 個のシステイン残基を有するタンパク質をコードする。本明細書中、
10 「タンパク質」という用語はペプチドを含むものと解される。なお、翻訳によっ
て合成されるタンパク質中のシステイン残基が、ジスルフィド結合を形成するた
めには、好ましくは、少なくとも 2 個以上のシステイン残基が、それぞれ、2 ア
ミノ酸残基以上、より好ましくは 3 アミノ酸残基以上離れていることが望まれる。
また、システイン残基は、アミノ酸配列中にある程度分散していることが好ま
15 く、N 末端側あるいは C 末端側に偏在しているものよりは、そうでない配列のほ
うが好ましい。また、最も N 末端側に位置するシステイン残基と最も C 末端側に
位置するシステイン残基が、好ましくは 5~50 個、より好ましくは 10~50 個離
れているタンパク質をコードする mRNA であることが望ましい。

本発明において用いられる mRNA としては、特にこれに限定されないが、好ま
20 しくは、10~200、より好ましくは 10~100、さらに好ましくは 15~50、さらに
好ましくは 20~40 個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものが挙
げられる。あまりに長いものは調製が困難であるし、あまりに短いものは合成さ
れるタンパク質が適当な立体構造をとりにくいからである。

尚、アミノ酸の種類は必ずしも 20 種類全てを含む必要はない。

25 本発明で用いられる mRNA は、上記のような条件を考慮して、適宜設計される。
なお、上記のような条件を満たす配列は、人為的にも容易に設計できるし、簡単

- 1 4 -

なコンピュータープログラムによっても容易に設計することができる。本発明においては、これらに限定されるものではないが、例えば、アミノ酸残基を 30 個有し、システインを 6 個有するタンパク質をターゲットとした場合は、例えば、下記のアミノ酸配列（式中、S1～S6 はシステイン残基を示し、A1～A30 はシステイン残基以外のアミノ酸残基（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、リシン、アルギニン又はヒスチジン）を有するタンパク質をコードする RNA が用いられる。

- 5 (1) A1-A2-S1-A4-A5-A6-S2-A8-A9-A10-S3-A12-A13-A14-S4-A16-A17-A18-S5-A2
0-A21-A22-S6-A24-A25-A26-A27-A28-A29-A30;
- (2) A1-A2-A3-S1-A5-A6-A7-S2-A9-A10-A11-S3-A13-A14-A15-S4-A17-A18-A19-S
5-A21-A22-A23-S6-A25-A26-A27-A28-A29-A30;
- (3) A1-S1-A3-A4-A5-A6-S2-A8-A9-A10-A11-S3-A13-A14-A15-A16-S4-A18-A19-A
15 20-A21-S5-A23-A24-A25-A26-S6-A28-A29-A30;
- (4) A1-S1-A3-A4-A5-A6-A7-S2-A9-A10-A11-A12-A13-S3-A15-A16-A17-A18-A19-S
4-A21-A22-A23-A24-S5-A26-A27-A28-S6-A30;
- (5) A1-A2-S1-A4-A5-S2-A7-A8-A9-A10-A11-A12-A13-S3-A15-S4-A17-A18-A19-A
20-A21-A22-A23-A24-S5-A26-A27-S6-A29-A30;
- 20 (6) A1-A2-A3-A4-A5-S1-A7-A8-S2-A10-A11-A12-A13-A14-A15-S3-A17-S4-A19-A
20-A21-S5-A23-A24-A25-S6-A27-S6-A29-A30;
- (7) A1-A2-A3-S1-A5-A6-A7-A8-A9-A10-A11-S2-A13-A14-A15-S3-A17-A18-A19-A
20-A21-S4-A23-A24-A25-S5-A27-A28-S6-A30;
- (8) A1-S1-A3-S2-A5-A6-A7-A8-A9-S3-A11-A12-S4-A14-A15-A16-A17-A18-A19-A
25 20-A21-A22-A23-S5-A25-A26-A27-S6-A29-A30;
- (9) A1-A2-A3-A4-A5-A6-S1-A8-A9-A10-S2-A12-A13-S3-A15-A16-A17-A18-A19-A

- 1 5 -

20-S₄-A22-A23-A24-A25-A26-S₅-A28-S₆-A30；又は

(10) A1-S₁-A3-A4-A5-A6-S₂-A8-S₃-A10-S₄-A12-A13-A14-A15-A16-A17-S₅-A19-A20-A21-A22-A23-A24-S₆-A26-A27-A28-A29-A30。

なお、既に公知のアミノ酸配列あるいは核酸配列から、上記条件を満たす配列

5 を検索し、これに基づいて所望の核酸配列を設計することもできる。このような公知のアミノ酸配列又は核酸配列情報は、公知のデータベース、例えば、PDB（プロテインデータバンク）、GenBank (National Center for Biotechnology Information)、EMBL (European Bioinformatics Institute, EBI)、DDBJ (国立遺伝学研究所) 等から入手可能である。

10 また、タンパク質の立体構造の形成には、ジスルフィド結合以外にも、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力などの種々の要素が関与している。また、 α -ヘリックス、 β -シート、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、ヘリック

15 スターンヘリックス、ヘリックスループヘリックス等を形成するアミノ酸配列も当業者には公知である。したがって、必要に応じてこれらの要素も考慮し、公知

のコンピューター・アシスティッド・モレキュラー・デザインの手法を用いて、より適切な配列を設計することもできる。例えば、 β シート構造を3つほど有する

と、それらの β シート構造間で水素結合を形成することが知られており、このような情報は、システイン残基によるS-S結合以外の立体構造形成のための情報として有用である。そのような配列設計のための有用な情報として下記文献が参考となる。

(1) Nielsen, KJ, et al. J. Mol. Recognit., 2000 ; 13 : 55-70

(2) Norton, RS, & Pallaghy, Toxicon, 1998 ; 36 : 1573-1583.

(3) Kim JII, et al., J. Mol. Biol. 1995 ; 250 : 659-671

(4) Goldenberg, DP., et al., Protein Science, 2001 ; 10 : 538-550.

25 (5) Miles, LA., et al., J. Biol. Chem., 2002 ; 277 : 43033-43040.

- 1 6 -

(mRNA の調製)

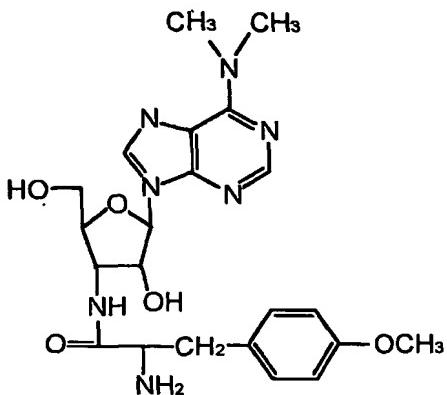
本発明で用いられる mRNA は、上記のようにしてそれがコードすべきアミノ酸配列を設計すれば、後は公知の核酸合成手法に基づいて合成することができる (PerSeptive Biosystems, DNA/RNA Synthesis System, 1995)。また、このような mRNA は、上記のようにして設計したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA を合成し、その DNA を転写反応に供することによって容易に調製することができる (Krupp G & Soll D, FEBS Lett. 1987, 212, 271-275.)。

また、本発明の好ましい態様によれば、上記の設計方法に基づき、DNA 合成機によって、所望のタンパク質群をコードする DNA ライブライリーを作成し、この DNA ライブライリーから転写される mRNA を用いることができる。

(ピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物)

上記のようにして得られる mRNA を、通常、mRNA の 3' 末端にスペーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物を連結して、mRNA-PM 連結体を調製する。ここで、ピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物は、mRNA-PM 連結体を翻訳系に投入してタンパク質を合成する際に、mRNA と翻訳されたタンパク質とを連結するヒンジあるいは連結部の役割をする。すなわち、mRNA にスペーサーを介してピューロマイシンを結合したものと翻訳系を接触させると、その mRNA がピューロマイシンを介して翻訳されたタンパク質と結合した *In vitro* virus ピリオング生成することが知られている (Nemoto et al., FEBS Lett. 414, 405 (1997) 参照)。ピューロマイシン (Puromycin) は、その 3' 末端がアミノアシル tRNA に化学構造骨格が類似している、下記式 (I) :

- 17 -



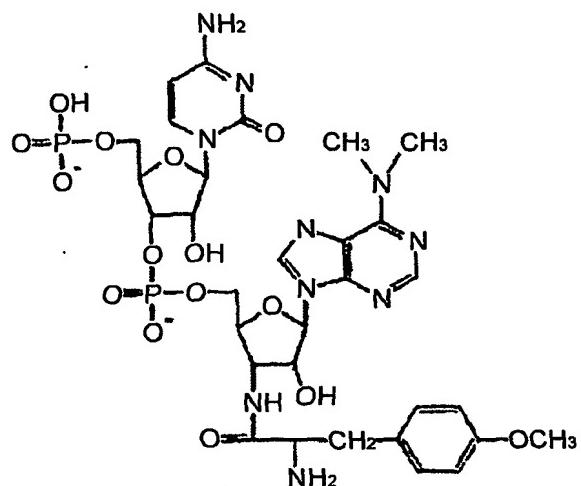
(I)

に示される化合物で、翻訳系でタンパク質の合成が行われた際に、合成されたタンパク質の C 末端に結合する能力を有する。本明細書中、「ピューロマイシン様化合物」とは、その 3' 末端がアミノアシル tRNA に化学構造骨格が類似し、翻訳系でタンパク質の合成が行われた際に、合成されたタンパク質の C 末端に結合する能力を有する化合物をいう。

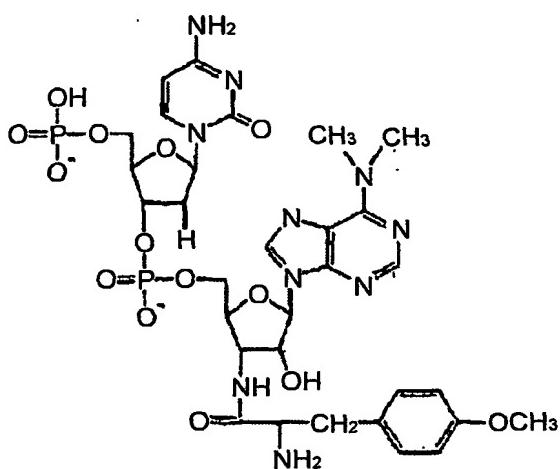
ピューロマイシン様化合物としては、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (*3'-N-Aminoacylpuroomycin aminonucleoside*、PANS-アミノ酸)、例えば、アミノ酸部がグリシンの PANS-Gly、アミノ酸部がバリンの PANS-Val、アミノ酸部がアラニンの PANS-Ala、その他、アミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応する PANS-アミノ酸化合物が挙げられる。また、3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した 3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (*3'-Aminoacyladen osine aminonucleoside*、AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの AANS-Gly、アミノ酸部がバリンの AANS-Val、アミノ酸部がアラニンの AANS-Ala、その他、アミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応する AANS-アミノ酸化合物を使用できる。また、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども使用できる。なお、上記ピューロマイシン以外に好ましく用いられるピューロマイシン様化合物は、リボシチジルピューロマイシン (rCpPu)

- 1 8 -

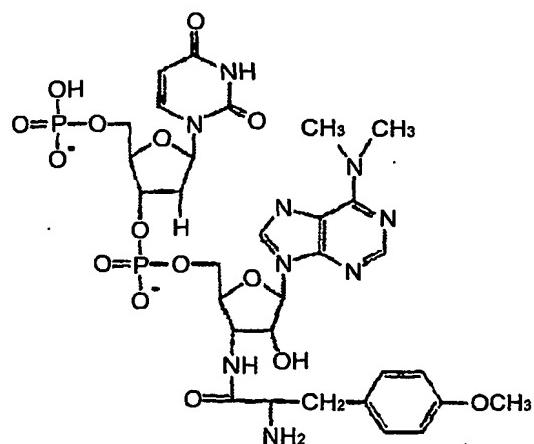
r) 、デオキシジルピューロマイシン (dCpPur) 、デオキシリジルピューロマイシン (dUpPur) などであり、下記にその化学構造式を示す。



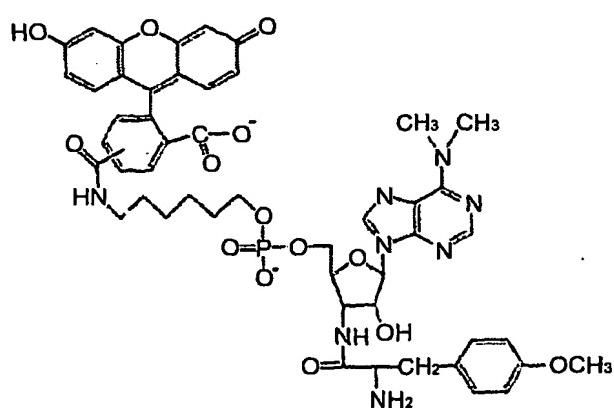
rCpPur



dCpPur

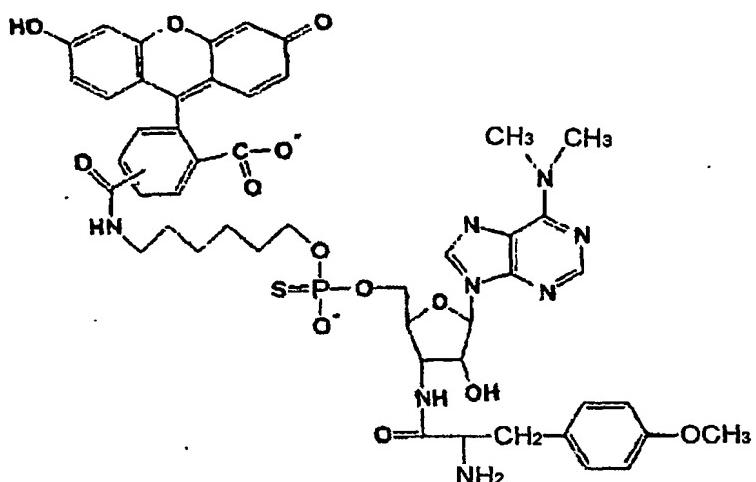


dUpPur



Fluoropur

- 19 -



Fluorothiopur

(スペーサー)

本発明の mRNA-PM 連結体においては、mRNA とピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物（以下、単に「ピューロマイシン」と称する）は、スペーサーを介して連結される。また、この連結体は、好ましくは、このスペーサーに設けられた固相結合部位を介して固相に固定化される。スペーサーは、主として、ピューロマイシンをリボソームの A サイトと呼ばれる部位に効率良く取り込ませるために用いられる。従って、スペーサーとしては、そのような性質を有する限り特に限定されないが、柔軟性があり、親水性で、側鎖の少ない単純な構造を有する骨格を有するものが好ましい。具体的には、ここで用いられるスペーサーとして、これらに限定されないが、ポリヌクレオチド（DNA 含む）、ポリエチレンなどのポリアルキレン、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、ペプチド核酸（PNA）、ポリスチレン等の直鎖状物質又はこれらの組合せを主骨格として含むものが好ましく用いられる。上記直鎖上物質を組み合わせて用いる際は、適宜、それらを適当な連結基（-NH-、-CO-、-O-、-NHC0-、-CONH-、-NHNH-、- $(CH_2)_n$ -[n は例えば 1~10、好ましくは 1~3]、-S-、-SO-など）で化学的に連結することができる。

- 2 0 -

mRNA とスペーサーとの連結は、公知の手法を用いて直接的又は間接的に、化学的又は物理的に行うことができる。例えば、DNA をスペーサーとして用いる場合は、mRNA の 3' 末端にその DNA スペーサーの末端と相補的な配列を設けておくことにより、両者を連結することができる。また、スペーサーとピューロマイシンを連結する場合は、通常、公知の化学的手法によって連結される。

なお、タンパク質を合成した後に、mRNA-PM-タンパク質の複合体を固相から切り離す必要がある場合は、スペーサー中に切断可能部位を設けると好ましい。DNA をスペーサーの一部に用いた場合は、そのような切断可能部位として、DNA 鎖中に制限酵素認識部位を設けることができる。このような制限酵素認識部位をもつスペーサーを用いた場合は、タンパク質合成後など所望の時に、制限酵素（例えば、Alu I、BamH I、EcoR I、Hind II、Hind III、Pvu II など）を投入することによって、mRNA-PM-タンパク質の複合体を固相から切り離すことができる。制限酵素認識部位とその部位を切断する酵素の組合せは公知である（New England BioLabs 2000・01 Catalog & Technical reference 等参照）。

なお、本発明の mRNA-PM 連結体には、必要に応じて標識物質を結合させることによって標識することができる。そのような標識物質は、蛍光性物質、放射性標識物質などから適宜選択される。蛍光物質としては、フリーの官能基（例えば活性エステルに変換可能なカルボキシル基、ホスホアミダイトに変換可能な水酸基、あるいはアミノ基など）を持ち、スペーサー又はピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物に連結可能な種々の蛍光色素を用いることができる。適当な標識物質としては、例えばフルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシリクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質；³H、¹⁴C、¹²⁵I 若しくは¹³¹I 等の放射性同位体などが挙げられる。

- 21 -

mRNA-PM 連結体が固定される固相は特に限定されず、その連結体が使用される目的に応じて適宜選択される。本発明で用いられる固相としては、生体分子を固定する担体となるものを用いることができ、例えば、スチレンビーズ、ガラスピーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ等のビーズ；ガラス基板、シリコン（石英）基板、プラスチック基板、金属基板（例えば、金箔基板）等の基板；ガラス容器、プラスチック容器等の容器；ニトロセルロース、ポリビニリデンフルオリド（PVDF）等の材料からなるメンブレンなどが挙げられる。

本発明の mRNA-PM 連結体を固相に固定する場合は、mRNA が翻訳系と接触する際に、その翻訳の障害とならないように固定すればよく、その固定化手段は特に限定されない。通常は、mRNA と PM を連結するスペーサーに固相結合部位を設け、その固相結合部位を、固相に結合させた「固相結合部位認識部位」を介して、mRNA-PM 連結体を固相に固定する。固相結合部位は、mRNA-PM 連結体を所望の固相に結合し得るものであれば特に限定されない。例えば、このような固相結合部位として、特定のポリペプチドに特異的に結合する分子（例えば、リガンド、抗体など）が用いられ、この場合は、固相表面には固相結合部位認識部位として、その分子と結合する特定のポリペプチドを結合させておく。固相結合部位／固相結合部位認識部位の組合せの例としては、例えば、アビジン及びストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質／ビオチン、マルトース結合タンパク質／マルトース、G タンパク質／グアニンヌクレオチド、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、DNA 結合タンパク質／DNA、抗体／抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン／カルモジュリン結合ペプチド、ATP 結合タンパク質／ATP、あるいはエストラジオール受容体タンパク質／エストラジオールなどの、各種受容体タンパク質／そのリガンドなどが挙げられる。これらの中で、固相結合部位／固相結合部位認識部位の組合せとしては、アビジン及びストレプトアビジンなど

- 22 -

のビオチン結合タンパク質／ビオチン、マルトース結合タンパク質／マルトース、
ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチ
オン-S-トランスフェラーゼ／グルタチオン、抗体／抗原分子（エピトープ）
などが好ましく、特にストレプトアビシン／ビオチンの組合せが最も好ましい。

5 上記タンパク質の固相表面への結合は、公知の方法を用いることができる。そ
のような公知の方法としては、例えば、タンニン酸、ホルマリン、グルタルアル
デヒド、ビルビックアルデヒド、ビスージアゾ化ベンジゾン、トルエン-2, 4-ジ
10 イソシアネート、カルボキシル基、又は水酸基あるいはアミノ基などを利用する
方法を挙げることができる (P. M. Abdella, P. K. Smith, G. P. Royer, A New Cleavabl
15 e Reagent for Cross-Linking and Reversible Immobilization of Proteins, Bi
ochem. Biophys. Res. Commun., 87, 734 (1979) 等参照)。

なお、上記組合せは、固相結合部位と固相結合部位認識部位とを逆転させて用
いることもできる。上記の固定化手段は、2つの相互に親和性を有する物質を利
用した固定化方法であるが、固相がスチレンビーズ、スチレン基板などのプラス
15 チック材料であれば、必要に応じて、公知の手法を用いてスペーサーの一部を直
接それらの固相に共有結合させることもできる (Qiagen 社、LiquiChip Applica
tions Handbook 等参照)。なお、本発明においては、固定手段については上記
の方法に限定されることなく、当業者に公知である如何なる固定手段をも利用す
ることができる。

20

2. 工程 (b) : mRNA-PM-PRT 連結体 (群) の調製

工程 (b) では、mRNA-PM 連結体を翻訳系と接触させることによって、タン
パク質の合成を行い、mRNA-PM-PRT 連結体 (群) を調製する。ここで用いるこ
とができる翻訳系としては、無細胞翻訳系又は生細胞などが挙げられる。無細胞
25 翻訳系としては、原核又は真核生物の抽出物により構成される無細胞翻訳系、例
えば大腸菌、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽抽出物などが使用できる (Lamfrom H,

- 23 -

Grunberg-Manago M. Ambiguities of translation of poly U in the rabbit reticulocyte system. Biochem Biophys Res Commun. 1967 27 (1) : 1-6 等参照)。

生細胞翻訳系としては、原核又は真核生物、例えば大腸菌の細胞などが使用できる。本発明においては、取り扱いの容易さから、無細胞系を使用することが好ま

5 しい。

さらに必要に応じて、ジスルフィド結合 (S-S 結合) を形成させるために、得られた mRNA-PM-PRT 連結体 (群) を酸化還元処理に供する。例えば、得られた mRNA-PM-PRT 連結体 (群) をジチオスレイトール (DTT) などの還元剤の存在下、0~35°Cで、0.5~3 時間反応させて還元する。次に、このように処理された mRNA-PM-PRT 連結体 (群) を 0-ヨードソ安息香酸等の酸化剤の存在下、適当なバッファー (例えば pH. 7 の 50mM リン酸バッファー) 中、0~35°Cで、5 分~1 時間反応させる。必要に応じて各処理後、適当な洗浄用バッファー (例えば、Washing Buffer (Tris-HCl pH. 8.0, NaCl 100mM)) で洗浄する。

なお、本発明の好ましい態様によれば、前記スペーサーの固相結合部位は切断可能部位を有しており、工程 (b) においては、固相上でタンパク質を確実にフォールディングさせた後に、その切断可能部位を切断して mRNA-ピューロマイシータンパク質連結体 (群) を固相から切り離し、そして切り離された mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) を工程 (c) に供するようとする。このような操作をすることにより、タンパク質を確実にフォールディングさせた後にスクリーニングや機能解析をすることができる。

本発明においてタンパク質のフォールディングは、好ましくは、該タンパク質中に含まれるシステイン残基中の SH 基を酸化し、ジスルフィド結合を形成させることによって、実施することができる。このようにして形成されるタンパク質は、安定な立体構造を呈する。通常、タンパク質の機能は、その立体構造に依存することから、本発明の方法においては、立体構造に依存する機能タンパク質を、効率的にスクリーニングすることが可能である。

- 24 -

本発明の好ましい態様においては、固相に結合された状態のタンパク質についてフォールディングされることが好ましい。固相に結合された本発明の連結体を酸化反応に供することにより、効率的に S-S 結合を形成させることができる。

5 3. 工程 (c) : タンパク質と標的物質との相互作用の測定

上記工程 (c) においては、工程 (b) において調製された mRNA-PM-PRT 連結体（群）と 1 以上の標的物質とを接触させる。ここで用いられる「標的物質」とは、本発明において合成されるタンパク質と相互作用するか否か調べるための物質を意味し、具体的にはタンパク質、核酸、糖鎖、低分子化合物などが挙げら
10 れる。

タンパク質としては、特に制限はなく、タンパク質の全長であっても結合活性部位を含む部分ペプチドでもよい。またアミノ酸配列、及びその機能が既知のタンパク質でも、未知のタンパク質でもよい。これらは、合成されたペプチド鎖、生体より精製されたタンパク質、あるいは cDNA ライブラリー等から適当な翻訳
15 系を用いて翻訳し、精製したタンパク質等でも標的分子として用いることができる。合成されたペプチド鎖はこれに糖鎖が結合した糖タンパク質であってもよい。これらのうち好ましくはアミノ酸配列が既知の精製されたタンパク質か、あるいは cDNA ライブラリー等から適当な方法を用いて翻訳、精製されたタンパク質を用いることができる。

20 核酸としては、特に制限されることはなく、DNA あるいは RNA も用いることができる。また、塩基配列あるいは機能が既知の核酸でも、未知の核酸でもよい。好ましくは、タンパク質に結合能力を有する核酸としての機能、及び塩基配列が既知のものか、あるいはゲノムライブラリー等から制限酵素等を用いて切断単離してきたものを用いることができる。

25 糖鎖としては、特に制限はなく、その糖配列あるいは機能が、既知の糖鎖でも未知の糖鎖でもよい。好ましくは、既に分離解析され、糖配列あるいは機能が既

知の糖鎖が用いられる。

低分子化合物としては、特に制限されず、機能が未知のものでも、あるいはタンパク質に結合する能力が既に知られているものでも用いることができる。

なお、これら標的物質とタンパク質との「相互作用」とは、通常は、タンパク質と標的分子間の共有結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合、及び静電力による結合のうち少なくとも1つから生じる分子間に働く力による作用を示すが、この用語は最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。共有結合としては、配位結合、双極子結合を含有する。また静電力による結合とは、静電結合の他、電気的反発も含有する。また、上記作用の結果生じる結合反応、合成反応、分解反応も相互作用に含有される。

相互作用の具体例としては、抗原と抗体間の結合及び解離、タンパク質レセプターとリガンドの間の結合及び解離、接着分子と相手方分子の間の結合及び解離、酵素と基質の間の結合及び解離、核酸とそれに結合するタンパク質の間の結合及び解離、情報伝達系におけるタンパク質同士の間の結合と解離、糖タンパク質とタンパク質との間の結合及び解離、あるいは糖鎖とタンパク質との間の結合及び解離が挙げられる。したがって、相互作用力は、2つの物質の結合の程度（結合定数）及び／または解離の程度（解離定数）を測定することによって判断することができる。（LeTilly V. & Royer CA, Biochemistry. 1993, 32, 7753-7758）。なお、本明細書中、「酸化還元により標的物質との結合定数が変化する」とは、通常、数値が1桁以上（例えば、 10^9 が 10^8 ）変化することをいう。

ここで用いられる標的物質は、必要に応じて標識物質により標識して用いることができる。必要に応じて標識物質を結合させることによって標識することができる。そのような標識物質は、蛍光性物質、放射性標識物質などから適宜選択される。蛍光物質としては、フリーの官能基（例えば活性エステルに変換可能なカルボキシル基、ホスホアミダイトに変換可能な水酸基、あるいはアミノ基など）を持ち、標的物質に連結可能な種々の蛍光色素を用いることができる。適当な標

- 2 6 -

識物質としては、例えばフルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシリクロライド、テトラメチルローダミンイソチオシアネートもしくは Cy3 等の蛍光物質；³H、¹⁴C、¹²⁵I 若しくは¹³¹I 等の放射性同位体などが挙げられる。これらの標識物質は、標的物質と固定化タンパク質との間の相互作用に基づいて発生される信号の変化の測定又は解析方法に適したもののが適宜用いられる。上記標識物質の標的物質への結合は、公知の手法に基づいて行うことができる。

工程 (c) において、該タンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを測定する。該タンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かの測定は、両分子間の相互作用に基づいて発生される信号の変化を測定、検出することにより行う。そのような測定手法としては、例えば、表面プラズモン共鳴法 (Cullen, D. C., et al., Biosensors, 3 (4), 211-225 (1987-88))、エバネッセント場分子イメージング法 (Funatsu, T., et al., Nature, 374, 555-559 (1995))、蛍光イメージングアナライズ法、固相酵素免疫検定法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : Crowther, J. R., Methods in Molecular Biology, 42 (1995))、蛍光偏光消解法 (Perran, J., et al., J. Phys. Rad., 1, 390-401 (1926))、及び蛍光相關分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) : Eigen, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5740-5747 (1994)) 等が挙げられる。

また、両分子間の相互作用は、単純に、両分子が結合するか否かを判定することによって行うことができ、両分子の特異的親和性を利用した方法（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）によってそのような結合実験を行うことができる。具体的には、セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上（例えばビーズ、フィルター、メンブレン等の担体）に標的物質を常法により固

- 27 -

定化（物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化）し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填し、該カラム（例えば、円柱状カラム）に、試料を通して溶出させることにより、該試料中に含まれる、標的物質に結合する mRNA

5 A-PM-PRT 連結体を分離することができる。またこのような操作を行なうことによって、標的物質に結合しなかったタンパク質を本スクリーニングプロセスから排除することができ、必要なタンパク質のみを選別することができる。あるいは、両分子の特異的親和性を利用した方法としてアフィニティービーズ法によつて結合実験を行うことができる（文献、Ogata Y, et al., Anal Chem. 2002; 74: 4702-4708）。具体的にはストレプトアビジンを表面に結合させた磁性体ビーズまたは標的分子をアミノ基などを介して表面に固定した磁性体ビーズを用いる。ビオチン化した標的分子に結合する mRNA-PM-PRT 連結体はストレプトアビジンビーズと接触させた後、磁石でストレプトアビジン磁性体ビーズを回収することによって分離することができる。また、標的分子を表面に固定した磁性体ビーズと mRNA-PM-PRT 連結体とを接触させた後に磁石で磁性体ビーズを回収することによって分離することができる。他にも、ビーズが磁性体でなく、アガロースビーズ等の場合は、磁石の代わりに遠心機を用いてビーズのみ沈殿させて回収することで分離することが可能である。

本発明の方法においては、必要に応じて、さらに、工程 (c) において相互作用していると判断されたタンパク質-標的物質結合体中の、タンパク質及び／又は標的物質を同定する。タンパク質の同定は、通常のアミノ酸配列シークエンサーで行うこともできるし、該タンパク質に結合している mRNA から DNA を逆転写し、得られた DNA の塩基配列を解析することによって行うこともできる。標的物質の同定は、NMR、IR、各種質量分析などによって行うことができる。

- 28 -

本発明においては、好ましくは、工程 (c) に続いて、さらに、(d) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含む mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）の mRNA から逆転写により DNA を調製し、さらにその DNA に変異を導入することによって改変された配列を有する mRNA を調製し、この mRNA を工程 5 (a) に供し、次いで上述のように工程 (b) 及び (c) の処理を行うことによって、標的物質との相互作用力を強化したタンパク質を取得することができる。ここで、前記 DNA の変異は、Error-Prone PCR 法 (Gram H, et al, Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89, 3576-80.) 、DNA Shuffling 法 (Stemmer WP, Nature. 1994, 370, 389-391) 等の公知の方法によって行うことができる。本発明においては、DNA にランダムに低確率で変異を導入することができる、Error-Prone PCR 法が好ましい。なお、Error-Prone PCR 法のキットは、Stratagene 社から GeneMorph PCT Mutagenesis Kit (GeneMorph は商標) として市販されている。このような方法を利用すると、上記工程 (a) ~ (c) において、ある標的物質に対して少しでも相互作用するタンパク質を取得できた場合に、そのタンパク質の 10 アミノ酸配列をランダムに改変して、より活性の強いタンパク質を取得することができる。したがって、上記工程 (a) ~ (d) を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力をより強化したタンパク質を取得することができる。

また、このような工程を複数回（例えば、2~10 回、好ましくは 4~8 回）繰り返すことによって、ある特定の標的物質と相互作用するタンパク質が複数取得 20 できた場合は、それら複数タンパク質のアミノ酸配列のコンセンサス配列情報等に基づいて新たなアミノ酸配列を有するタンパク質を設計し、これを前記工程 (a) に供することによって、さらに高い活性を有するタンパク質を取得することが可能となる。

このようにして得られたタンパク質は、公知の有機合成手法に基づいて有機合成することができる（泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）（19 25 75 年）等参照）。なお、このようなスクリーニング方法によって得られるタン

パク質は、標的物質の生理的機能を調整する、生理活性物質として、種々の医薬用途に用いることができる。

また上記工程 (c) においては、mRNA—ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と標的物質とを接触させるが、本発明においては、該 mRNA—ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中の mRNA から逆転写により DNA を調製し、DNA—ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製した後、該連結体(群)を標的物質と接触させててもよい。

通常、DNA 分子は RNA 分子より安定であることが知られている。また、DNA 分子は、RNA 分子と比べてアルカリに強いため、例えば、架橋反応に供する場合、DNA—ピューロマイシン-タンパク質連結体は、より化学反応を行い易い利点を有する。

また、本発明においては、本発明の上記工程によって調製される DNA/mRNA—ピューロマイシン-連結体(群)を、一旦保存した後に、適宜、保存された該連結体を標的分子との接触に供することも可能である。通常、DNA 分子は、凍結、融解を繰り返しても安定であるが、RNA 分子は、凍結、融解を繰り返すことにより通常、分解され易いことが知られている。さらに、RNA 分子は DNA 分子と比べて非特異的な相互作用の影響が大きいことが知られており、従って、本発明において、標的分子との接触に供する連結体は、DNA—ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)であることが好ましい。

即ち、本発明の好ましい態様においては、以下の工程 (a) ~ (d) を含む、システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法に関する。

(a) 少なくとも 2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする mRNA を 25 1 以上調製し、得られた mRNA のそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結して mRNA—ピューロマイシン連結体(群)を得る

- 30 -

工程

(b) 工程 (a) で得られた mRNA-ピューロマイシン連結体 (群) と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) を調製する工程

5 (c) 工程 (b) で得られた mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) の mRNA から逆転写により DNA を調製し、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体を調製する工程

(d) 工程 (c) において調製された DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) と 1 以上の標的物質とを接触させ、DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体 (群) 中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

15 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の一実施態様に係るスクリーニング方法の概要を示す図である。

図 2 は、mRNA へ、ピューロマイシン付きスペーサーDNA を共有結合させたものの概略図を示す図である。

図 3 は、PM 付きスペーサーDNA の概略図を示す図である。P はピューロマイシン、F は FITC、B はビオチン、A, T, C, G は DNA、a, u, g, c は RNA のシーケンスを示している。四角枠で囲った部分は制限酵素 Pvu II サイトを示す。RNA の 3' 末端と DNA の 5' 末端は “T4 RNA Ligase” と示した部分でライゲーションされるように合成した。

図 4 は、全長 DNA ライブライリーの配列構成を示す図である。

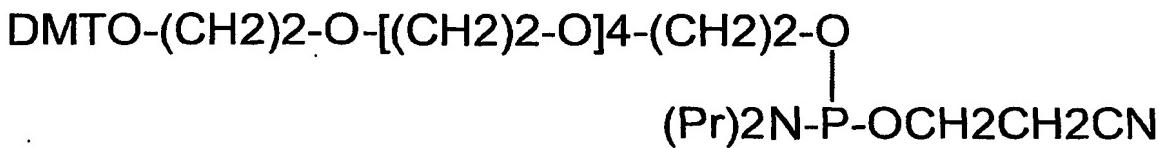
- 31 -

以下、本発明を実施例に基づいてより具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実験例 1

1. スペーサーBioLoop-Puro (以下“PM 付きスペーサーDNA”と略す) の合成

5 Puro-F-S [配列 ; 5' - (S) -TC (F) - (Spec18) - (Spec18) - (Spec18) - (Spec18) -CC- (Puro) -3'、BEX 社より購入] 10 nmol を、100 μl の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) に溶かし、100 mM TCEP を 1 μl 加え (final 1 mM) 、室温で 6 時間放置し、Puro-F-S の Thiol を還元した。架橋反応を行う直前に 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) で平衡化した NAP5 (アマシャム、17-0853-02) を用いて TCEP (Tris 10 (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride) を除いた。なお、Puro-F-S の配列中、(S) は 5'-Thiol-Modifier C6、(Puro) は Puromycin CPG、Spacer18 は Gl en Research Search 社製のスペーサー (18-O-Dimethoxytritylhexaethylenegly col, 1-[(2-cyanoethyl) - (N, N-diisopropyl)]-phosphoramidite) で次の化学構造を有する。



15

0.2 M リン酸バッファー (pH 7.0) 100 μl に、500 pmol/μl Biotin-loop [(5 6 mer) 配列; 5'-CCCGG TGCAG CTGTT TCATC (T-B) CGGA AACAG CTGCA CCCCC CGC CG CCCCC CG (T) CCT-3' (配列番号 1、BEX 社より購入) 、(T) :Amino-Modifier C6 dT、(T-B) :Biotin-dT (アンダーラインは制限酵素 Pvull のサイトを示す)] 20 μl、100 mM 架橋剤 EMCS (344-05051; 6-Maleimidohexanoic acid N-hydroxysuccinide ester) 、Dojindo 社製) 20 μl、を加え、良く攪拌した後、37°C で 30 分放置した後に、未反応の EMCS を取り除いた。沈殿を減圧下で乾燥させた後、0.2 M リン酸バッファー (pH 7.0) 10 μl に溶かし、上記の還元した Puro-F-S (~10nmol) を加えて 4°C で一晩放置した。サンプルに最終で 4 mM になるように TCE

- 32 -

P₂を加え室温で15分放置した後、未反応のPuro-F-Sをエタノール沈殿で取り除き、未反応のBiotin-loopを取り除くために以下の条件でHPLC精製を行った。

カラム：nacalai tesque CSOMOSIL 37918-31 10 x 250 mm C18-AR-300 (Waters)

5 BufferA；0.1 M TEAA、BufferB；80%アセトニトリル（超純水で希釈したもの）

流速：0.5 ml/min (B%:15-35 % 33 min)

HPLCの分画は18%アクリルアミドゲル(8 M尿素、62℃)で解析し、目的の分画を減圧下で乾燥させた後、DEPC処理水で溶かして、10 pmol/μlにした。

10

2. 抗体様ペプチドの鑄型DNA作成

抗体様ペプチドの鑄型DNAは同一分子内に少なくとも2つ以上のS-S結合を形成させるために、一つのペプチド内に4つ以上のシステイン残基を含ませた。

したがって鑄型DNAはシステインに対応するコドン(UGU、UGC)のうちどれかを15 4つ以上含む配列を作成した。

本実施例では、下記アミノ酸配列(配列番号2又は3)を有するタンパク質をコードする下記DNAライブラリ(配列番号4又は5、ただしこの配列は相補的な配列)をDNA合成機(Applied Biosystems社製：3400)を用いて固相合成法によって合成した。

20 配列番号2：Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xa
a-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xa
a-Xaa-Xaa-Xaa

配列番号3：Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xa
a-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Xa
25 a-Xaa-Xaa-Xaa

配列番号4：TTTCCCCGCCCCCGTCCTGCTCCGCCGTGATGATGATGATGGCCTCCGCTTGG

- 3 3 -

AGGGCCGGAGGGNNNNNNNNNACANNNNNNNNNNNNNNNNNACANNNNNNNNNACANNN
 NNNNNNNNNACANNNNNNNACANNNNNNNACANNNNNNNCATGGTGGCTGTAGTTGAGAAT
 GTAAAATGTAATG

配列番号 5 : CATGGTGGCTGTAGTTGAGAATGTAAAATGTAATGNNNNNTGTNNNNNNNNNN

5 NNNNNNNNNNNNTGTNNNNNTGTNNNNNNNNNNNTGTNNNNNNNNNNNTGTNNNNNNNN
 TGTNNNNNNNNNNNCCTCCGGCCCTCCAAGCGGAGGCCATCATCATCATCACGGCGGAAGCAGGACG
 GGGGGCGGGGAA

また、これを鑄型にして DNA プライマー（配列番号 6 : CATTACATTTACATTCAC
 AACTACAAGCCACCATG、及び配列番号 7 : TTTCCCCGCCCCCGTCCT）を用いて PCR（条件
 10 : 热変性 95°C 2 分の後、热変性 95°C 30 秒、アニーリング 69°C 15 秒、伸長反応
 72°C 45 秒、サイクル数 30 回）を行い、エタノール沈殿により精製した後、T7 プ
 ロモーター配列と非翻訳領域配列をもつ DNA（以下、T7Ω と略す）（配列番号
 15 : GATCCCGCGAAATTAAATACGACTCACTATAAGGGAAAGTATTTACAACAATTACCAACAACAAC
 AAACAACAACAACATTACATTTACATTCTACAACATACAAGCCACCATG）をプライマーなしの PC
 R（条件 : 热変性 95°C 2 分の後、热変性 95°C 30 秒、アニーリング 60°C 15 秒、伸
 長反応 72°C 50 秒、サイクル数 30 回）を行い連結し、フェノール抽出、エタノー
 ル沈殿を行うことで精製した。これにより、5' 側に T7、Cap、オメガ配列、Kozak
 配列、3' 末端に x6 ヒスチジンタグの他にスペーサーDNA の一部と相補なタグ配
 列（5' 側-AGGACGGGGGGCGGGGAAA（配列番号 9）アンダーラインはスペーサー配列
 20 と相補な部分）を含む鑄型 DNA が合成された。

3. 転写

上記工程 2 で合成した DNA を鑄型として、以下のように *in vitro* 転写をプロ
 メガ社のプロトコルに従い行なった。DNA 8 μg に対し、m7G Cap Analog (Promega
 25 社) を最終濃度が 320 μM になるように加え、37°C で 1 時間反応させた。次に
 DNase、フェノール・クロロフォルム処理した後、DS Primer Remover (Edge Bio

- 3 4 -

systems) で精製し定量した。

4. mRNA と PM 付きスペーサーDNA の結合

5' キャップ及び 3' にタグ配列を持った mRNA 300 pmol に、PM 付きスペーサーD
5 NA を 300 pmol、10 x Ligation Buffer (TaKaRa) 6 μ l、DMSO 2.5 μ l を加え、5
5 μ l になるよう DEPC 処理水を加えた。熱湯上で 85°C から 35°C へ 20 分かけてア
ニーリングし、15 unit T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa、2.5 μ l) 、100 un
it T4 RNA Ligase (TaKaRa、2.5 μ l) を加え、25°C 45 分反応させた。サンプル
を RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) で処理した後、さらに DS Primer Remover
10 で精製した。

図 2 に、mRNA へ PM 付きスペーサーDNA を共有結合させたものの概略図を示す。
図 2 中、P はピューロマイシン、B はビオチン、ATCGu は DNA、RNA シーケンスを
示している。大文字で示した部分は制限酵素 PvuII サイト（四角枠で囲った部
分）を含む DNA 部分、小文字で示した部分は mRNA で、3' 末端側の DNA と相補鎖
15 を形成している部分が Tag 配列に結合している。RNA の 3' 末端と DNA の 5' 末端
は “T4 RNA Ligase” と示した部分でライゲートされている。

5. PM 付きスペーサーDNA-mRNA 複合体のビーズ上への結合

上記のように合成した、PM 付きスペーサーDNA と mRNA の複合体を、直径 2.3
20 μ m \pm 0.3 μ m のアビジンビーズ (MAGNOTEX-SA、TaKaRa、9088) へ、添付のプロ
トコルに基づき以下のようにして結合させた。

60 μ l のアビジンビーズを 200 μ l の x1 Binding Buffer (添付されたもの) で
2 回、マグネットスタンドを用いてアビジンビーズを沈殿させ、上清を交換する
ことで洗浄した。洗浄後、沈殿させたビーズへ、上記 2-2 で合成した PM 付きス
ペーサーDNA と mRNA の複合体を 48 pmol 加え、1 x Binding Buffer (添付され
25 たもの) を合計で 120 μ l になるように加え、10 分間室温で静置した。その後、

- 35 -

上記のように、 $200\mu\text{l}$ の $1\times$ Binding Buffer (添付されたもの) でビーズを洗浄することで、ビーズに結合しなかった PM 付きスペーサーDNA と mRNA の複合体を取り除いた。さらに、 $20\times$ Translation Mix (Ambion) $10\mu\text{l}$ 、DEPC 処理水 $190\mu\text{l}$ を加え、同様にビーズを洗浄した。

5

6. 翻訳

上記のビーズをマグネットスタンド上で沈殿させ、無細胞翻訳系 (Retic Lysate IVT Kit, Ambion 社, 1200) を $300\mu\text{l}$ 加え、 $30^\circ\text{C} 15$ 分翻訳反応を行った。その後、 MgCl_2 、 KCl をそれぞれ最終で 63 mM 、 750 mM になるように加えて 37°C で 1.5 時間放置した。サンプルは、約 1 時間毎に軽く攪拌した。上記のようにビーズを沈殿させ、SUPERase • In (Ambion 社、2694) 20 unit を含んだ $1\times$ Binding Buffer (添付されたもの) $200\mu\text{l}$ で 2 回ビーズを洗浄した。

7. 逆転写

15 洗浄後、上記と同様にして沈殿させたビーズに対して、TaKaRa BIOMEDICALS 社添付のプロトコルに従い、 $80\mu\text{l}$ のスケールで逆転写酵素 M-MLV (TaKaRa、264 0A) を用いて $42^\circ\text{C} 10$ 分間、逆転写反応を行った。その後に上記と同様にして、 $1\times$ Binding Buffer (添付されたもの) $200\mu\text{l}$ でビーズを洗浄した。

20 8. 酸化還元処理

上記工程 6 及び 7 で翻訳されてビーズに固定化されたペプチドを 100 mM の DT T (ジチオスレイトール) を用いて室温、1 時間反応させ還元したのち、Washing Buffer (Tris-HCl pH. 8.0, NaCl 100 mM) $200\mu\text{l}$ で 2 回ビーズを洗浄した。次にペプチドを酸化するために o-ヨードソ安息香酸 50 mM を用いて室温で 10 分、
25 pH. 7 の 50 mM リン酸バッファー中で反応後、Washing Buffer (Tris-HCl pH. 8.0, NaCl 100 mM) $200\mu\text{l}$ でビーズを 2 回洗浄した。

- 36 -

9. ビーズから DNA-タンパク質を回収

沈殿させたビーズに対して、添付のプロトコルに従い、 $40\mu l$ のスケールで 24 unit の制限酵素 PvuII (TaKaRa) で 37°C 1 時間放置することで、ビーズ上の DN

5 A-タンパク質をビーズから切り離す処理を行った。ここでは特に、ビーズと DN A-タンパク質の非特異的な吸着を避けるために、BSA を最終 0.1 mg/ml になるよう 15 に加えた。その後、上記と同様にしてビーズを沈殿させ、上清を新しいサンプルチューブに移した。

10. His タグ精製

Qiagen 社のプロトコルに従い、サンプルを等量の Lysis バッファー (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, Tween20 0.05%, pH 8.0) に希釈し、20 μl の Ni-NTA ビーズ (Ni-NTA MagneticAgaroseBeads、QIAGEN 社、36111) を加え、室温で 40 分攪拌しながら放置した。上記と同様にしてマグネットスタンド

15 で Ni-NTA ビーズを沈殿させ、 $100\mu l$ の Wash バッファー (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, Tween20 0.05%, pH 8.0) で軽く洗浄した。ビーズを沈殿させた後、Elute バッファー (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 250 mM, Tween20 0.05%, pH 8.0) を $15\mu l$ 加え 1 分間室温で放置し、DNA-タンパク質を溶出させた。

20

11. 選択過程

上記工程 10 で溶出した DNA-タンパク質は、ビオチンーセルロースゲル (sigma 社) を充填したカラムに流し、溶出されたものを回収した。次にこれと Fluorescein biotin (5-(N-(6-(biotinyl) amino) hexanoyl) amino) pentyl) thioureidyl

25 fluorescein) (Molecular Probes 社) を Binding buffer (50 mM リン酸バッファー、100 mM NaCl) で混合し、25°C で 1 時間インキュベーションした。次にア

- 37 -

ビジンピーズ (MAGNOTEX-SA、 TaKaRa 社) 20 μ l を加え、 室温で 10 分静置した。ここでマグネットを使いピーズを集めて、 バッファー交換した。 Binding buffer で 3 回ピーズを洗浄した後、 Elution buffer (50mM リン酸バッファー、 100mM NaCl、 50mM DTT) を加えて 1 時間室温で静置した。マグネットでピーズを底に集めた後、 上清を回収した。

1 2. PCR による選択分子の DNA 増幅

上記工程 1 1 で回収した DNA-タンパク質を 2 μ l 取り、 最終的な体積が 50 μ l になるように調整して PCR 反応に供した。この際、 プライマーは Ω -RT-L (5'-CA 10 ACA ACATT ACATT TTACA TTCTA CAACT ACAAG CCACC-3' (配列番号 1 0)) 、 Yta g-R (5'-TTTCC CCGCC CCCCCG TCCT-3' (配列番号 1 1)) を用い、 Taq ポリメラーゼは TaKaRa Ex Taq (Takara 社) 、 反応条件は熱変性 95°C 2 分の後、 热変性 9 5°C 30 秒 : アニーリング 69°C 15 秒 : 伸長反応 72°C 45 秒のサイクルを 30 回繰り返した。プライマーを除くためにプライマーリムーバー (Edge Science 社) を 15 用いて精製後、 エタノール沈殿した。

1 3. T7 プロモーター領域連結のための PCR

上記工程 1 2 で得られた DNA を RNA 化するために、 T7 プロモーターを連結した。そのため、 T7 プロモーター配列と非翻訳領域配列をもつ DNA (T7 Ω) (配列 20 番号 5) を用いてプライマーなしの PCR を行い連結し精製した。 (上記工程 2 と同じ)

1 4. 選択サイクルの繰り返し

上記工程 3 で得た DNA は再度、 上記工程 3 に戻し、 転写を行い、 以下、 工程 4 25 ~ 1 3 を 3 回繰り返した。

- 38 -

15. シーケンス

上記工程 1~4までで、最終的にこのサイクルを 4 回ほど回して得られた PCR 産物はプライマー (NewLeft) を用いてシーケンスを行った。その際、最初のライプラリーと各サイクルで得られた PCR 産物も同時にシーケンスを行い、ランダム 5 な配列が特定の配列に収束することを確認した。そこで、PCR 産物をクローニングし、20 本のクローンを選びだし、再度、シーケンスを行った。シーケンス結果からホモロジー配列を抽出した。

16. 有機合成

10 上記工程 1~5 で得られた DNA のホモロジー配列に基づいてアミノ酸配列に直し、有機的にペプチドの固相合成法によってペプチドを合成、ペプチドを固相から切り離す前に脱保護の後に上記工程 8 の酸化還元処理を行ったのち、切り離し回収した。

17. 結合アッセイ

合成されたペプチドが実際に FITC と結合能があるかどうかを調べるために蛍光偏光解消法を用いて解離定数を測定した。

なお、参考のため、図 1 に上記実施例のフローを示す概略図を示す。

20 実験例 2 蛍光分子 Cy3 に対する結合ペプチドの取得

1. PM付きスペーサーDNAの合成

PM付きスペーサーDNAは実験例 1 の方法に従って合成した。概略図を図 3 に示す。

25 2. *In vitro* ウィルスの合成のためのライプラリー作成

- 3 9 -

57 bpのランダムな領域を含むDNAライブラリーは、(株) ファスマックに依託合成した3本の一本鎖DNAフラグメント（配列番号12－14）をつなぎ合わせて完全長を作成した（図4）。配列番号12－14で示すようにfragment1と2、2と3が互いに20～30merの相補な配列を持つ。これら3本の一本鎖DNAフラグメントを、最初にfragment2と3、次に、fragment1の順で逐一伸長反応を行うことでつなぎ合わせて、全長のDNAライブラリーを得た（配列番号15）。伸長反応はEx Taq (TaKaRa) を用いて、熱変性95℃2分の後、熱変性95℃30秒、アニーリング69℃15秒、伸長反応72℃45秒のサイクルを18回繰り返すことで行った。完全長のDNAは5'末端にT7プロモーター、Cap、オメガ配列、Kozak配列、3'末端にヒスチジンタグ、転写したときにPM付きスペーサーDNAの一部と相補なタグ配列（図4中、“Y-tag”）を含む。配列番号15で“xyz”的19回の繰り返しで示した124bp-180bpのランダムな領域は、翻訳時に終止コドンの出現が少なくなるように、xはT 13%, C 20%, A 35%, G 32%, yはT 24%, C 22%, A 30%, G 24%, zはT 37%, C 37%, A 0%, G 26% (Protein Sci. 1993 Aug; 2(8):1249-54)、になるように特15殊ミックスした塩基を表す。配列表においては、“xyz”は“nnn”的繰り返しで示される。完全長のDNAは変性アクリルアミドゲルから切り出し精製した後、定量しそのまま転写反応に使用した。

配列番号12／fragment1(117mer) ; GATCCCGCGAAATTAAATACGACTCACTATAGGGGAAGT
ATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAAACAACAAACATTACATTCTACAACTACAAGC
20 CACCATG

配列番号13／fragment2(114mer) ; ACATTCTACAACATAAGCCACCATGGGATGXYZXYZ
XYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZ
25 CATC

配列番号14／fragment3(61mer) ; TTTCCCCGGCCGCCGGGTCTGCTTCCGGCGTGATGAT
25 GATGATGATGGCTGCCTCCCCC

配列番号15 : GATCCCGCGAAATTAAATACGACTCACTATAGGGGAAGTATTTACAACAATTACCAA

- 4 0 -

CAACAACAAACAAACAACAAACATTACATTTACATTCTACAACATAAGCCACCATGGGATGTXYZXYZX
YZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZXYZTGTGAGGGGGGAGGCAGCCATC
ATCATCATCATCACGGCGGAAGCAGGACGGGGGGCGGGGGAAA

転写は、プロメガ社のキット (Promega、 P1300) に付属するプロトコルに従い

5 DNA 2 μ g、 40 μ lスケールで行った。合成の際、 m7G Cap Analog (Promega、 P171
1) を加えた。37°Cで1時間放置した後、キット付属のDNase (RNase) を2 u
nit加え、さらに37°Cで15分放置することでテンプレートのDNAを分解した。フェ
ノール・クロロフォルム処理を行った後、 DS Primer Remover (Edge Biosystem
s) で精製した。

10

3. PM付きスペーサーDNAとmRNAの結合

転写した結果できたmRNA 450 pmolに、PM付きスペーサーDNAを450 pmol、10 x
Ligation Buffer (TaKaRa) 12 μ lを加え、112 μ lになるようDEPC処理水を加え
た。85°Cから25°Cへ10~15分かけてアニーリングし、T4 Polynucleotide Kinase
15 (TaKaRa) を24 unit、T4 RNA Ligase (TaKaRa) を80 unit加え、25°C40分反応
させた。後に、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、 74104) で精製した。

4. 翻訳 (*in vitro* ウィルスの合成)

PM付きスペーサーDNAとmRNAの複合体400 pmolを、無細胞翻訳系 (Retic Lysat
20 e IVT Kit, Ambion社, 1200) 2.5 mlスケールで翻訳した。翻訳は30°C10分間行
った。その後、MgCl₂、KClをそれぞれ最終で63 mM、750 mMになるように加えて3
7°Cで2時間放置することで、PM付きスペーサーDNA・mRNA・翻訳されたペプチド
の三者複合体を得た。翻訳のスケールは、セレクションの最初のラウンドのため
に上記のように400 pmol、2ndラウンドのために50 pmol、以降のラウンドのため
25 には20 pmolへスケールダウンして行った。

- 41 -

5. 逆転写

翻訳した産物400 pmol分を、付属のBindingバッファーであらかじめ洗浄した400 μlのアビジンビーズ (TaKaRa、9088、MAGNOTEX-SA) に結合させ、付属のバッ

ファーフで洗浄した後、直ちに400 pmolに対して、逆転写用のバッファー400 μl

5 (逆転写酵素M-MLV (TaKaRa、2640A) を4000 unit、dNTP 0.5mM、RNaseインヒビター (Ambion、2694、SUPERase·In) 400 unitを含む) に置換して、PM付きスペーサーDNA (配列番号1) の3'末端にある塩基“CCT”からmRNAの5'末端へ逆転写反応を行った (10分間、42°C)。

10 6. ビーズからDNA-タンパク質を回収

アビジンビーズから、翻訳した産物400 pmol分 (PM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA・翻訳されたペプチドの三者複合体、および翻訳に使用されなかったPM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA) を回収するため、225 unitの制限酵素PvuII (TaKaRa) 、0.01 % BSAを含む付属のバッファー300 μlに置換し、1時間37°Cで放置した。

15

7. Hisタグ精製

アビジンビーズを沈殿させた上清を回収し、Ni-NTAビーズ (QIAGEN、36111、Ni-NTA MagneticAgaroseBeads) 100 μlを使って、付属のプロトコルドおりに、His-tag精製を行い、翻訳に使用されなかったPM付きスペーサーDNA・mRNA・複合体

20 を取り除いた。His-tag精製した産物は、6 M尿素を含んだ6 % SDS-PAGEで解析し、バンドをMolecular imager FX (Bio RAD co.) でFITCの蛍光を可視化することで純度の確認および定量を行い、以下のセレクションに使用した。

8. Cy3-Sepharoseの作成

25 Cy3 (Amersham、Q13108、Cy3 monofunctional reactive dye to label 1.0 mg antibody or other protein) 1 vialをSepharoseゲル (Amersham、17-0569-01、

- 42 -

EAH Sepharose4B) 2 mlへ、20 mM Hepes pH 7.5、室温で2~6時間、攪拌させて結合させた。

9. 選択過程

5 精製されたPM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA・翻訳されたペプチドの三者複合体は、30分~2時間シェーカーで攪拌した後、1日~3日間4℃で放置することにより酸化させた。得られたPM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA・翻訳されたペプチドの三者複合体は、1stラウンドでは 27×10^{10} 、以降は 3×10^{10} 個程度で、これらほぼ全量をセレクションに使用した。セレクションは下記のように、ダミーカラム、Cy3カラムの順で各ラウンド1本ずつ使用して行った。

最初に、ダミーカラム (Sephadexゲルを空のカラム (Amersham, 27-3565-01, MicroSpin Columns) にカラムのベッドボリューム約 $400 \mu\text{l}$ 程度になるように充填したもの) へ、精製されたPM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA・翻訳されたペプチドの三者複合体をアプライし、フロースルー (アプライした量の1~1.5倍) を回収した。カラムは、使用前に10カラムボリューム以上のカラム用バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 M NaCl、0.1 % TritonX100、1 mM EDTA) で平衡化した。

次に、カラム用バッファー10カラムボリューム以上で平衡化したCy3カラム (Cy3-Sepharoseを空のカラムにカラムボリューム約 $350 \mu\text{l}$ 程度になるように充填したもの) へ、回収したダミーカラムのフロースルーを流速0.1~0.3 ml/分でアプライすることで、Cy3カラムへ結合させた。カラム用バッファーで洗浄 (14 column volume (cv) ~63 cv) した後、最終濃度50 mMのDTT (Wako, 047-08973, Dithiothreitol) を含むカラム用バッファーでCy3カラムに結合しているPM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA・翻訳されたペプチドの三者複合体を溶出した (流速0.1~0.3 ml/分)。

溶出されたPM付きスペーサーDNA・mRNA/DNA・翻訳されたペプチドの三者複合体は脱塩・濃縮の後、PCRで增幅し (プライマー; 配列番号 16 / 5'-CAACAAACATT

- 4 3 -

ACATTTACATTCTACAACATAAGCCACC-3'、配列番号 1 7 / 5'-TTTCCCCGCCGCCCCCGTC
CTGCTTCCGGCGTGATGAT-3'、熱変性95°C 2分の後、熱変性95°C 30秒、アニーリング6
9°C 15秒、伸長反応72°C 45秒のサイクルを30回繰返し）、精製したPCR産物にfrag
ment1をライゲーションすることで、再び全長のDNAを得た。後に、転写、PM付き
5 スペーサーとのライゲーション、翻訳、精製を行い、次のラウンドのセレクションに使用した。

1 0. クローニング

上記のようなセレクションを13回連続して行った後のDNAを、ベクターpDrive
10 (QIAGEN、231222、PCR Cloning Kit) ヘライゲーション、QIAGEN EZ Competent
Cellヘトランスフォーメーション、LBプレートで培養を行い、25個のコロニー
をランダムに選びDNAのシーケンス解析を行った。シーケンス解析は(株)日立ハ
イテクノロジーズへ依頼した。25個のクローンの解析結果全てについて、115 bp
～180 bpをアミノ酸の一文字表記に変換して配列番号 1 8 - 4 2 へ示した。
15 25個のクローンのうち、44 %のクローンにはN末端-SCGMLCTHVRHHSRFHMVH (配
列番号 4 3)、16 %のクローンにはN末端-SVFGLQCGNMGHVHDSIH (配列番号 4
4)、4 %のクローンにはN末端-TLVGSGNPNVGSVIHLHCH (配列番号 4 5) が含まれ
ていた。

13ラウンド後に選択された配列を以下に示す。なお、配列中のアスタリスク
20 (*) は終止コドンに対応する部位を表す。：

配列番号 1 8 : MGCSCGMLCTHVRHHSRFHMVH

配列番号 1 9 : MGCSDSARVPLGMAVCVTSSAI

配列番号 2 0 : MGCSCGMLCTHVRHHSRFHMVH

配列番号 2 1 : MRISRPVMNEGRWLIYLLS

25 配列番号 2 2 : MGRSVHFGLQCGNMGHVHDSIH

配列番号 2 3 : MGCSCGMLCTHVRHHSRFHMAN

- 4 4 -

配列番号 2 4 : MGCS CGML CTHVRHHSHFHMVH

配列番号 2 5 : MGCTLVGSGNPNVGSVIHLHCH

配列番号 2 6 : MGCS CGML CTHVRHHSRFHMVH

配列番号 2 7 : MGCS CGML CTHVRHHSRFHMVH

5 配列番号 2 8 : MGCS CGML CTHVRHHSRFHMVH

配列番号 2 9 : MGCCNSTGVVVGVLFGP*D*MHC

配列番号 3 0 : MGCSVHFGLQCGNMGHVHDSIH

配列番号 3 1 : MGCSMSSVHMCFCPAGR DVIS

配列番号 3 2 : MGCI TFIGECGRFVDGGCFNNN

10 配列番号 3 3 : MGCRARGVGVDYISRRDHKS HH

配列番号 3 4 : MGCDLQRVGCAVSATVETCGNS

配列番号 3 5 : MGCS CGML CTHVRHHSRFHMVH

配列番号 3 6 : MGCSVHFGLQCGNMGHVHDSIH

配列番号 3 7 : MGCTLVGSGNPNVGSVIHLHCH

15 配列番号 3 8 : MGCSVHFGLQCGNMGHVHDSIH

配列番号 3 9 : MGCS CGML CTHVRHHSRFHMVH

配列番号 4 0 : MGCS CGML RTHVRHHSRFHMVH

配列番号 4 1 : MGCI SAGDSVCVTDNVDLPSNT

配列番号 4 2 : MGCS CGML CTHVRHHSRFHMHR

20

1.1. Cy3との結合定数決定

標的分子が低分子でかつ蛍光をもつCy3であるため、蛍光偏向解消法によってKdを求めた。ただし、上述したような無細胞翻訳系では十分な量のペプチドを回収することが困難なため、（1）大腸菌による発現精製、（2）ペプチド合成、
25 で測定に十分な量（10 μg）を確保した後、蛍光偏向解消装置（BEACON2000、Invitrogen社）によって測定した。

- 45 -

(1) 大腸菌による発現精製

上記スクリーニングで得られたコンセンサス配列“SCGMLCTHVRHHSRFHMVH（配列番号43）”のN末端にMGCを連結した“MGCSCGMLCTHVRHHSRFHMVH（配列番号18）”のC末端側にリンカーとして“GGGSGGGS（配列番号46）”を加えさらにタグ配列（XXX）として、1) GST(Glutathione S-Transferase) Geneと2) His-tagを連結した。

発現ベクターに組み込む遺伝子領域は、“MGCSCGMLCTHVRHHSRFHMVH—GGGSGGGS-XXX”とした。ここでXXXは、1) XXX=GST（配列番号47）、2) XXX=His-tag（配列番号48）の2通りである。

1) GST融合タンパク質

-GST Gene Fusion System (Amersham Bioscience社) を用いてペプチドの発現及び精製を行った。その際、発現ベクターpGEM-1λEcoR1/BAP (Amersham Bioscience社) にインサートするために、BamH1サイトとXho1サイトを両端にもつ配列番号：49および配列番号50に示すDNA相補鎖を作成した。

上記の配列コードする2種類のDNAをファスマック（株）で合成し、それぞれ100 pMずつを20 mM Tris-HClバッファーで溶かした後、95℃5分間、20分間でゆっくり室温まで冷まし、アニーリングさせハイブリダイゼーションを行った。その後、BamH1とXho1で制限酵素処理した後に、同様にBamH1とXho1で処理し精製したpGEM-1λEcoR1/BAPをQuickLigation Kit (New England Biolab) を用いて1時間反応させた。作成したプラスミドはAmersham Bioscience社のGST融合タンパク質の発現と検出のプロトコールにしたがい、大腸菌に形質転換後、目的プラスミドをもつクローンを選択した。ここでクローンをシーケンスし確認を行った。次に通常のプロトコールに従い大腸菌を培養した。大腸菌はSDSを含むバッファーを用いて5分間95℃で煮た後、12% SDS-PAGEで解析した。CBB染色で確認後、抗GST

- 4 6 -

ヤギ抗体を用いてウェスタンプロッティングを行い、GST融合タンパク質の発現を確認した。次にAmersham Bioscience社のBulk GST Purification Moduleに添付のプロトコールに従いタンパク質の精製を行った。100 mlの培養液で大腸菌を培養後、培養液を8,000×g、10分間遠心分離を行った。回収した菌体のペレットを
5 開始バッファーに懸濁、氷冷下、超音波で処理した。不溶物除去のために12,000×g、4°C、10分間の遠心分離後、沈殿物を開始バッファーで懸濁した。上精および沈殿をSDS-PAGEして目的のタンパク質を確認した。次にAmersham Bioscience社のGSTrap FFのプロトコールに従い、Hitrap Desaltingカラムによりバッファー中のグルタチオンを除去した。GSTタグについては上述のプロトコールに従い
10 切断、除去したものと切断せず精製したものを調製した。

2) His-tag

-The QIAexpress System (QIAGEN社) を用いてペプチドの発現・精製を行った。このシステム用の発現ベクターpQE-30 Xa (QIAGEN社) のマルチクローニングサイトには、N末端側にBamH1、C末端側にはHindIIIをもつ必要があるため、上述のコンセンサス配列の両端に制限酵素配列をもつ配列番号51および52に示すような配列をもつDNA相補鎖をファスマック（株）で合成した。

合成されたDNAはそれぞれ20 mM Tris-HClバッファーで100 pmol溶かした後、95°C 5分間、20分間でゆっくり室温までアニーリングしてハイブリダイゼーションさせた。その後、BamH1とHindIIIで制限酵素処理した後に、同様にBamH1とHindIIIで処理し精製したpQE-30 XaをQuickLigation Kit (New England Biolab社) を用いて1時間反応させた。作成したプラスミドはQIAGEN社のプロトコール「The QIAexpressionist」に従い、①トランスフォーメーション ②トランスフォーメーション体の選択 ③目的タンパク質の溶解度の決定 ④ 変性常態下での精製をおこなった。この場合もFactor XaによってHis-tagを除去したものと除去していないものの両方を調整した。

(2) ペプチド合成

ペプチド合成は部位特異的にS-S結合架橋させる技術をもつペプチド研究所に以下の配列は同じであるがS-S架橋が異なる3種類のペプチド合成を依頼した。

5 (C1) (C2) (C3) はシステインのインデックスを表す。

MG (C1) S (C2) GML (C3) THVRHHSRFHMVH (配列番号 5 3) 、

MG (C1) S (C2) GML (C3) THVRHHSRFHMVH (配列番号 5 4) : (C1) と (C3) がS-S架橋したもの、

10 MG (C1) S (C2) GML (C3) THVRHHSRFHMVH (配列番号 5 5) : (C1) と (C2) がS-S架橋したもの、

MG (C1) S (C2) GML (C3) THVRHHSRFHMVH (配列番号 5 6) : (C2) と (C3) がS-S架橋したもの。

-これらは、いずれも1 mg以上の収量が得られた。

15 (3) ペプチド酸化処理

(1) で精製したタンパク質はpH 7.0の50 mMリン酸バッファーに溶解し、オーバーナイトした。あるいは、o-ヨードソ安息香酸50mMを用いて室温で10分、pH 7の50 mMリン酸バッファー中で反応させた。

20 (4) 蛍光偏向消度測定

(2) のペプチド及び(3)の酸化処理したそれぞれのペプチドを最終濃度1 μMになるように50 mMのリン酸バッファーに溶解した。次にそれぞれのペプチド溶液を2倍ごとに希釈した。つまり500 pM、250 pM、125 pM、62.5 pM、31.25 pM、16 pM、8 pM、4 pM、2 pM、1 pM、0.5 pM、0.25 pM、0.125 pM、0.6 pMの各濃度になるようにし、いずれも100 μl以上用意した。これらの溶液に最終濃度1 pMになるようにCy3を加えた。10分ほど室温で静置したのち、BEACON2000

- 48 -

(Invitrogen社) で偏向解消度を順次測定した。得られたデータは、グラフ解析ソフトGraphPad PRISMによって、Kdを求めた。

測定の結果、各サンプルとも $1\mu\text{M}$ ～ $100\mu\text{M}$ の間のKd値をとり、十分に結合することがわかった。

5

産業上の利用の可能性

本発明のスクリーニング方法によれば、種々の立体構造を構成する種々のタンパク質を設計し、そのタンパク質と標的物質との相互作用を容易に判定できる形態で調製し、それをスクリーニング工程に供することができるので、ある標的物
10 質と相互作用するタンパク質を容易にスクリーニングすることができる。

また、本発明の別の態様によれば、ある標的物質と相互作用する有用タンパク質のアミノ酸配列をランダムに改変して、さらにその改変されたタンパク質の活性を測定することによって、有用タンパク質のアミノ酸配列の最適化を容易に行
うことができるという利点がある。このようなスクリーニング方法によって得ら
15 れるタンパク質は、標的物質の生理的機能を調整する、生理活性物質として、種々の医薬用途に用いることができる。

請求の範囲

1. システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、
 - (a) 少なくとも2以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードするmRNAを1以上調製し、得られたmRNAのそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結してmRNA-ピューロマイシン連結体(群)を得る工程；
 - (b) 工程(a)で得られたmRNA-ピューロマイシン連結体(群)と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)を調製する工程；及び
 - (c) 工程(b)において調製されたmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)と1以上の標的物質とを接触させ、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；を含む上記スクリーニング方法。
2. 工程(c)に続いて、さらに、(d)前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含むmRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体(群)のmRNAから逆転写によりDNAを調製し、さらにそのDNAに変異を導入することによって改変された配列を有するmRNAを調製し、このmRNAを工程(a)に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記請求項1に記載の方法。
3. システイン残基をアミノ酸配列中に導入することによってジスルフィド結合を有するタンパク質を合成し、そのタンパク質の機能を解析することによって有用タンパク質をスクリーニングする方法であって、

- 50 -

- (a) 少なくとも 2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする mRNA を 1 以上調製し、得られた mRNA のそれぞれをピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結して mRNA-ピューロマイシン連結体（群）を得る工程；
- 5 (b) 工程 (a) で得られた mRNA-ピューロマイシン連結体（群）と、翻訳系とを接触させてタンパク質を合成し、 mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）を調製する工程；
- (c) 工程 (b) で得られた mRNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）の mRNA から逆転写により DNA を調製し、 DNA-ピュ
- 10 ロマイシン-タンパク質連結体を調製する工程；及び
- (d) 工程 (c) において調製された DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）と 1 以上の標的物質とを接触させ、 DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）中のいずれかのタンパク質と該標的物質とが相互作用しているか否かを判定する工程；
- 15 を含む上記スクリーニング方法。
4. 工程 (d) に続いて、さらに、 (e) 前記標的物質と相互作用をするタンパク質を含む DNA-ピューロマイシン-タンパク質連結体（群）における DNA に変異を導入することによって改変された配列を有する mRNA を調製し、この mRNA を工程 (a) に供することによって、標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記請求項 3 に記載の方法。
- 20 5. 工程 (a) において、前記 mRNA-ピューロマイシン連結体が、 mRNA の 3' 末端にスペーサーを介してピューロマイシン又はピューロマイシン様化合物と連結した構造である前記請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。
6. 工程 (a) において、前記 mRNA が、 2 以上のシステイン残基を含むタンパク質をコードする DNA から転写されることによって調製される、前記
- 25 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

- 51 -

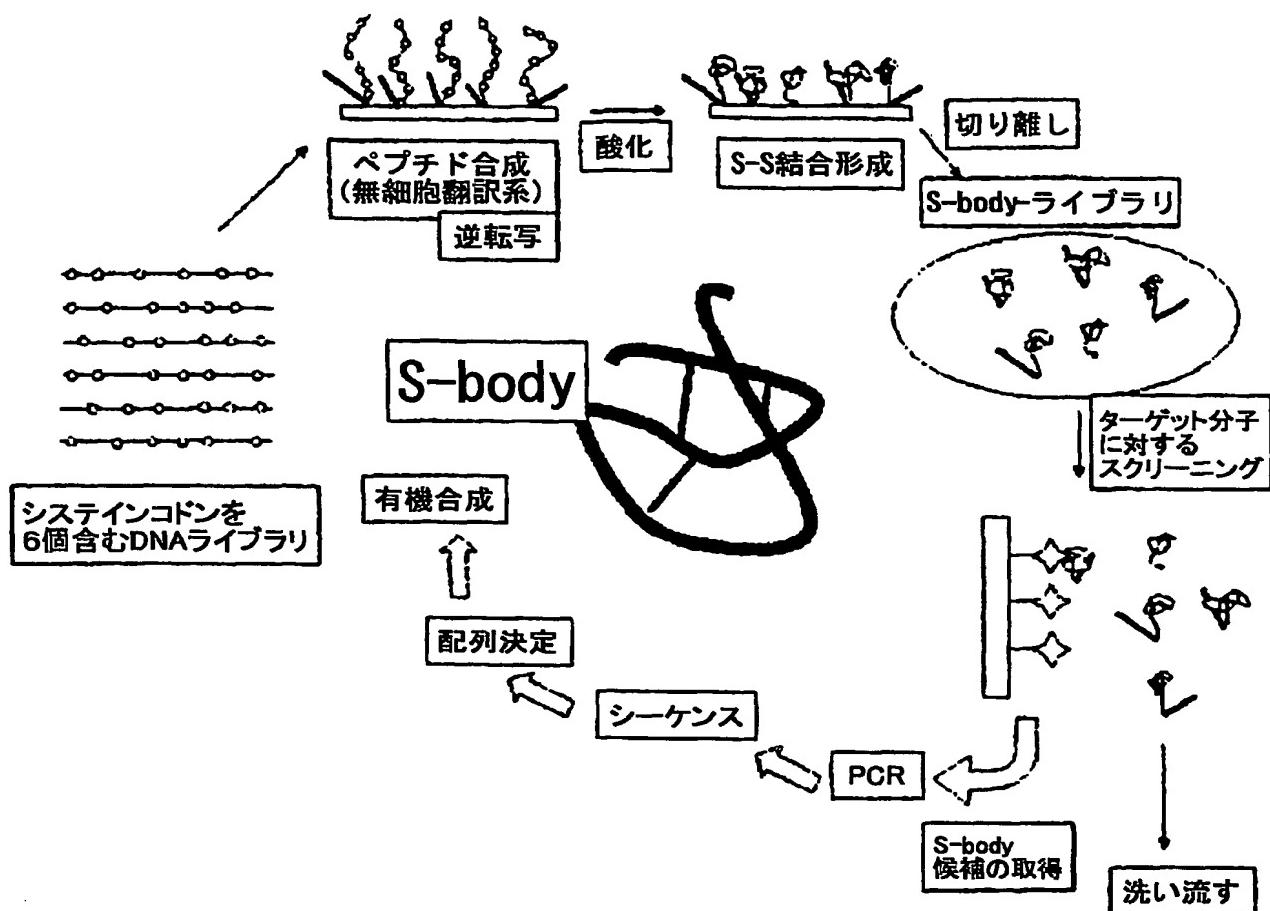
7. 工程 (b) において用いられる翻訳系が無細胞翻訳系である、前記請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。
8. 前記タンパク質と前記標的物質とが相互作用しているか否かの判定が、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法又はアフィニティービーズ法によつて両者が結合しているか否かを判断することによって行われる、前記請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。
- 5 9. 相互作用していると判断されたタンパク質及び／又は標的物質を同定する工程をさらに含む、前記請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。
10. 前記DNAの変異がError-Prone PCRによって行われる、前記請求項 2、
10 または 4～9 のいずれかに記載の方法。
11. 前記の各工程を複数回繰り返すことによって標的物質との相互作用力が強化されたタンパク質を取得する、前記請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。
12. 前記mRNAが、8～500個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～11 のいずれかに記載の方法。
- 15 13. 前記mRNAが、10～200個のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～12 のいずれかに記載の方法。
14. 前記mRNAが、2～10個のシステイン残基を有するタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～13 のいずれかに記載の方法。
- 20 15. 前記mRNAが、隣接するシステイン残基がそれぞれ 2～20 個離れて存在するようにアミノ酸配列中に分散しているタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。
16. 前記mRNAが、最もN末端側に位置するシステイン残基と最もC末端側に位置するシステイン残基が 5～50 個離れているタンパク質をコードするものである、前記請求項 1～15 のいずれかに記載の方法。
- 25 17. 前記スペーサーが、ポリヌクレオチド、ポリエチレン、ポリエチレング

- 5 2 -

リコール、ポリスチレン、ペプチド核酸又はこれらの組合せを主骨格として含むものである、前記請求項 5～16 のいずれかに記載の方法。

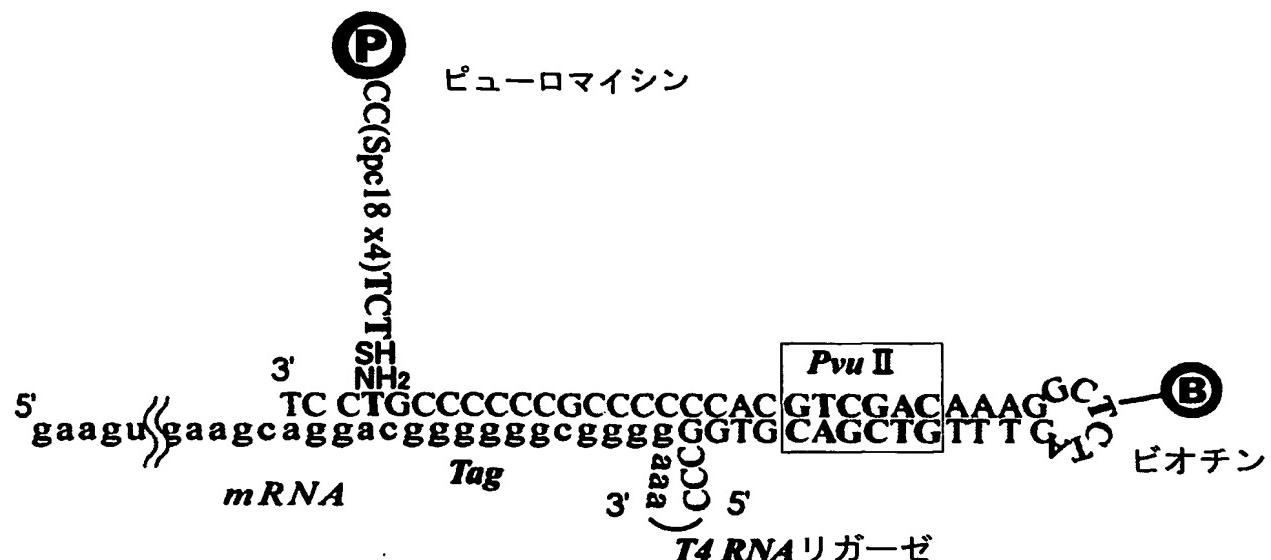
18. 前記スペーサーは固相結合部位を有し、前記mRNA—ピューロマイシン連結体が、その固相結合部位を介して固相に結合されている、前記請求項 5～17 のいずれかに記載の方法。
19. 前記固相が、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板、ガラス容器、プラスチック容器及びメンブレンから選択される、前記請求項 18 に記載の方法。
- 10 20. 前記スペーサーの固相結合部位が切断可能な部位を有するものであり、固相上でタンパク質をフォールディングさせた後に、前記切断可能部位を切断する工程を含む、前記請求項 18 又は 19 に記載の方法。
21. 前記スペーサーがDNAスペーサーであり、前記切断可能部位が制限酵素認識部位である、前記請求項 20 に記載の方法。
- 15 22. 前記請求項 1～21 のいずれかの方法によって得られるタンパク質であつて、8～500 のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を 2～10 個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。
23. 8～500 のアミノ酸残基を有し、ジスルフィド結合をするためのシステイン残基を 2～10 個含み、かつ酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質。

図 1



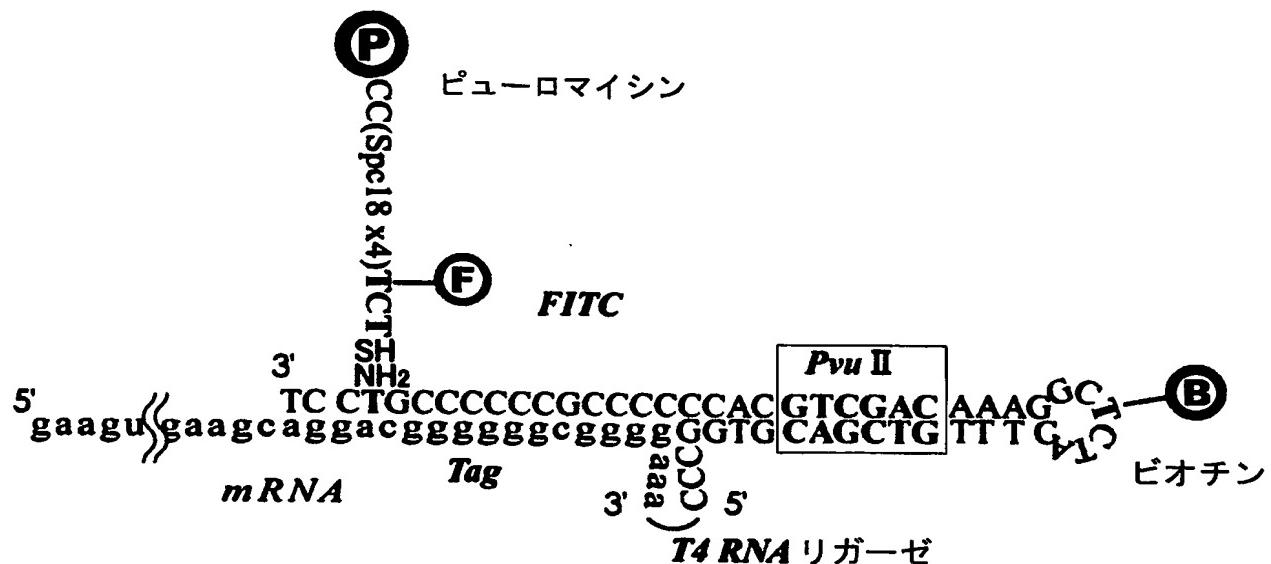
2 / 4

図 2



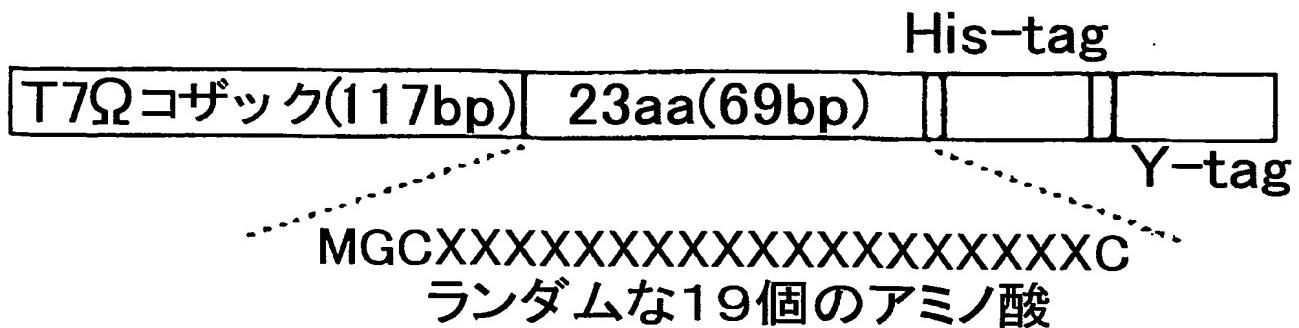
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



1 / 4 2

SEQUENCE LISTING

<110> GENEFIELD, INC.

<120> A method of screening a useful protein

<130> BVC-A0301Y1P

<150> JP 2003-205139

<151> 2003-07-31

<150> JP 2003-416228

<151> 2003-12-15

<160> 56

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

2 / 4 2

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> Biotin is bonded to the 20th cytosine.

<400> 1

cccggtgcag ctgtttcatc cgaaacagc tgcacccccc gccgcccccc gtcct

55

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(8)

<223> "Xaa" = any amino acids.

3 / 4 2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(12)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(17)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(22)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(31)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(36)

<223> "Xaa" = any amino acids.

4 / 4 2

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

20

25

30

Xaa Xaa Xaa Xaa

35

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (2)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 / 4 2

<222> (4) .. (12)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14) .. (15)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17) .. (21)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23) .. (27)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (31)

<223> "Xaa" = any amino acids.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33) .. (36)

6 / 4 2

<223> "Xaa" = any amino acids.

<400> 3

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa

35

<210> 4.

<211> 215

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (71)..(82)

<223> "n" = a, t, g, or c.

7 / 4 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (86)..(109)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (113)..(124)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (128)..(139)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (143)..(151)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (155)..(163)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

8 / 4 2

<221> misc_feature

<222> (167)..(178)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<400> 4

tttccccgcc ccccggtcctg ctccgcgt gatgtatgtg atgtatggcct ccgcgttggag 60

ggccggaggg nnnnnnnnnn nnacannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnna cannnnnnnn 120

nnnnacannn nnnnnnnnnna cannnnnnnn nacannnnn nnnacannnn nnnnnnnnnca 180

tggtggttg tagtgtaga atgtaaaatg taatg. 215

<210> 5

<211> 215

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(43)

<223> "n" = a, t, g, or c.

9 / 4 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)..(73)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (77)..(82)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (86)..(100)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (104)..(118)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (122)..(130)

<223> "n" = a, t, g, or c.

1 0 / 4 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (134)..(145)

<223> "n" = a, t, g, or c.

<400> 5

catggtggct tgtatgtta gaatgtaaaa tgtaatgnnn nnntgtnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnntgtnnnn nntgtnnnn nnnnnnnnnn tgtnnnnnn nnnnnnnntg 120

tnnnnnnnnn tgtnnnnnnn nnnncacctc cggccctcca agcgaggccc atcat'catca 180

tcatcacggc ggaagcagga cggggggcgg ggaaa 215

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

cattacattt tacattctac aactacaagg caccatg

37

1 1 / 4 2

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

tttccccgcc ccccggtcct

19

<210> 8

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

gatccgcga aattaatacg actcaactata gggaaagtat tttacaaca attaccaaca 60

acaacaacaa acaacaacaa cattacattt tacattctac aactacaagc caccatg 117

1 2 / 4 2

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

aggacggggg gcggggaaa

19

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

caacaacatt acattttaca ttctacaact acaagccacc

40

<210> 11

1 3 / 4 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

tttccccgcc ccccggtcct

19

<210> 12

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 12

gatccgcga aattaatacg actcactata gggaaagtat tttacaaca attaccaaca 60

acaacaacaa acaacaacaa cattacattt tacattctac aactacaagc caccatg 117

<210> 13

1 4 / 4 2

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(89)

<223> "nnn" is repeated 19 times. In the "nnn", 1st n indicates mixture of 13% T, 20% C, 35% A, 32% G, 2nd n indicates mixture of 24% T, 22% C, 30% A, 24% G, and 3rd n indicates mixture of 37% T, 37% C, 0% A, 26% G

<400> 13

acattctaca actacaaggcc accatgggat gtnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnt gtgagggggg aggcagccat catc 114

<210> 14

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

1 5 / 4 2

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 14

tttccccgcc gcgcgcgc tcgtctccgc cgtgatgatg atgatgatgg ctgcctcccc 60

c

61

<210> 15

<211> 247

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (124)..(180)

<223> "nnn" is repeated 19 times. In the "nnn", 1st n indicates mixture of 13% T, 20% C, 35% A, 32% G, 2nd n indicates mixture of 24% T, 22% C, 30% A, 24% G, and 3rd n indicates mixture of 37% T, 37% C, 0% A, 26% G

<400> 15

16 / 42

gatccgcga aattaatacg actcaactata gggaaagtat tttacaaca attaccaaca 60

acaacaacaa acaacaacaa cattacattt tacattctac aactacaagc caccatggga 120

tgtnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180

tgtgaggggg gaggcagcca tcatcatcat catcacggcg gaagcaggac gggggcggc 240

ggggaaa 247

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

caacaacatt acattttaca ttctacaact acaagccacc 40

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

1 7 / 4 2

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

tttccccgcc gcgcggcgtc ctgcttcgc cgtgatgat

39

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 18

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 19

1 8 / 4 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 19

Met Gly Cys Ser Asp Ser Ala Arg Val Pro Leu Gly Met Ala Val Cys
1 5 10 15

Val Thr Ser Ser Ala Ile

20

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 20

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser
1 5 10 15

1 9 / 4 2

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 21

Met Arg Ile Ser Arg Pro Val Met Asn Glu Gly Arg Trp Leu Ile Tyr

1

5

10

15

Leu Leu Ser

<210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

2 0 / 4 2

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 22

Met Gly Arg Ser Val His Phe Gly Leu Gln Cys Gly Asn Met Gly His

1

5

10

15

Val His Asp Ser Ile His

20

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 23

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Ala Asn

20

21 / 42

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 24

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

-
His Phe His Met Val His

20

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 25

22 / 42

Met Gly Cys Thr Leu Val Gly Ser Gly Asn Pro Asn Val Gly Ser Val

1

5

10

15

Ile His Leu His Cys His

20

<210> 26

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 26

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

2 3 / 4 2

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 27

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser
1 5 10 15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 28

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 28

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser
1 5 10 15

Arg Phe His Met Val His

2 4 / 4 2

20

<210> 29

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> "Xaa" = The site corresponding to termination codon.

<400> 29

Met Gly Cys Cys Asn Ser Thr Gly Val Val Val Gly Val Leu Phe Gly

1

5

10

15

Pro Asp Xaa Met His Cys

20

<210> 30

<211> 22

2 5 / 4 2

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 30

Met Gly Cys Ser Val His Phe Gly Leu Gln Cys Gly Asn Met Gly His

1

5

10

15

Val His Asp Ser Ile His

20

<210> 31

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 31

Met Gly Cys Ser Ser Met Ser Ser Val His Met Cys Phe Cys Pro Ala

1

5

10

15

2 6 / 4 2

Gly Arg Asp Val Ile Ser

20

<210> 32

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 32

Met Gly Cys Ile Thr Phe Ile Gly Glu Cys Gly Arg Phe Val Asp Gly

1

5

10

15

Gly Cys Phe Asn Asn Asn

20

<210> 33

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

27 / 42

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 33

Met Gly Cys Arg Ala Arg Gly Val Gly Val Asp Tyr Ile Ser Arg Arg

1

5

10

15

Asp His Lys Ser His His

20

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 34

Met Gly Cys Asp Leu Gln Arg Val Gly Cys Ala Val Ser Ala Thr Val

1

5

10

15

Glu Thr Cys Gly Asn Ser

20

28 / 42

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 35

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 36

Met Gly Cys Ser Val His Phe Gly Leu Gln Cys Gly Asn Met Gly His

2 9 / 4 2

1

5

10

15

Val His Asp Ser Ile His

20

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 37

Met Gly Cys Thr Leu Val Gly Ser Gly Asn Pro Asn Val Gly Ser Val

1

5

10

15

Ile His Leu His Cys His

20

<210> 38

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

3 0 / 4 2

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 38

Met Gly Cys Ser Val His Phe Gly Leu Gln Cys Gly Asn Met Gly His

1

5

10

15

Val His Asp Ser Ile His

20

<210> 39

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 39

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His

20

3 1 / 4 2

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 40

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Arg Thr His Val Arg His His Ser
1- 5 10 15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 41

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

3 2 / 4 2

<400> 41

Met Gly Cys Ile Ser Ala Gly Asp Ser Val Cys Val Thr Asp Asn Val
1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser Asn Thr

20

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 42

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser
1 5 10 15

Arg Phe His Met His Arg

20

<210> 43

<211> 19

3 3 / 4 2

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 43

Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser Arg Phe His

1

5

10

15

Met Val His

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 44

Ser Val His Phe Gly Leu Gln Cys Gly Asn Met Gly His Val His Asp

1

5

10

15

3 4 / 4 2

Ser Ile His

<210> 45

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> A peptide sequence encoded by selected DNA.

<400> 45

Thr Leu Val Gly Ser Gly Asn Pro Asn Val Gly Ser Val Ile His Leu

1

5

10

15

His Cys His

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

3 5 / 4 2

<223> an artificially synthesized peptide linker sequence.

<400> 46

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

<210> 47

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> "Xaa" indicates Glutathione S-Transferase.

<400> 47

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Xaa

20

25

30

3 6 / 4 2

<210> 48

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> "Xaa" indicates His-tag.

<400> 48

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Xaa

20

25

30

<210> 49

<211> 105

<212> DNA

3 7 / 4 2

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence.

<400> 49

ggggatccg gttgtcatg tggcatgcta tgcacacatg ttccatca ttcacgattc 60
catatggtgc acggtggtgg atctggtgga gggtctcgaa ttcta 105

<210> 50

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence.

<400> 50

tagaattcga gaccctccac cagatccacc accgtgcacc atatgaaatc gtgaatgtg 60
ccgaacatgt gtgcatacgta tgccacatga gcaaccggat ccccc 105

<210> 51

<211> 106

<212> DNA

3 8 / 4 2

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence.

<400> 51

actggatccg gtgtctcatg tggcatgcta tgcacacatg ttccggcatca ttcacgattc 60
catatggtgc acggtggtgg atctggtgga gggctctcaag cttaat 106

<210> 52

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence.

<400> 52

attaaggctt agaccctcca ccagatccac caccgtgcac catatggaaat cgtgaatgtat 60
gccgaacatg tgtgcatacg atgccacatg agcaaccgga tccagt 106

<210> 53

<211> 22

<212> PRT

3 9 / 4 2

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence.

<400> 53

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 54

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> "Cys" indicates the cysteine that binds to 9th amino acid "Cys" by S-S bond.

4 0 / 4 2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9) . . (9)

<223> "Cys" indicates the cysteine that binds to 3rd amino acid "Cys" by S-S bond.

<400> 54

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser
1 5 10 15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) . . (3)

41 / 42

<223> "Cys" indicates the cysteine that binds to 5th amino acid "Cys" by S-S bond.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> "Cys" indicates the cysteine that binds to 3rd amino acid "Cys" by S-S bond.

<400> 55

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser
1 5 10 15

Arg Phe His Met Val His

20

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence.

<220>

4 2 / 4 2

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> "Cys" indicates the cysteine that binds to 9th amino acid "Cys" by S-S bond.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> "Cys" indicates the cysteine that binds to 5th amino acid "Cys" by S-S bond.

<400> 56

Met Gly Cys Ser Cys Gly Met Leu Cys Thr His Val Arg His His Ser

1

5

10

15

Arg Phe His Met Val His

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, C07K14/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, C07K14/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-500066 A (Ikutsuirion GmbH. & Co. KG.), 07 January, 2003 (07.01.03), & WO 03/25178 A & AU 2002335168 A	1-21
Y	Yasuro OSHIMA, "Tanpakushitsu no Tainetsu Sekkei", Kagaku Kogyo, Vol.38, No.3, pages 223 to 226, 1987	1-21
Y	JP 2003-189878 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 08 July, 2003 (08.07.03), & DE 19923966 A & WO 00/71747 A & AU 200036591 A & EP 1185704 A & CZ 200104210 A & CN 1413262 A	1-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 August, 2004 (27.08.04)Date of mailing of the international search report
14 September, 2004 (14.09.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/011308**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 22, 23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Even though the number of amino acid residues and the number of cysteine residues are restricted, the invention according to 23 involves a great number of proteins. Since the target substances are not specified, the outer limit of the synthesized proteins with a change in (continued to extra sheet.)
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 22 relate to a method of screening a useful protein based on the interaction between a protein conjugate obtained by translating mRNA-puromycin and a target substance and a protein obtained by this screening method.

On the other hand, the invention according to claim 23 relates to a synthetic protein being limited in the number of amino acid residues and the number of cysteine residues and showing a change in binding constant to a target substance due to oxidation/reduction.

It cannot be recognized that there is any single general inventive concept between these groups of inventions.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011308

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

binding constant is unclear. Although the invention according to claim 22 is limited to a screening method, the mRNA to be used is unclear and, therefore, the outer limit of the invention remains unclear.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/011308

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1' G01N 33/50 G01N 33/15 C07K 14/00 C12N 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1' G01N 33/50 G01N 33/15 C07K 14/00 C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-500066 A(イクトイリオン・グーエムベーハー・ウント・ ニー・カーゲー)2003.01.07 & WO 03/25178 A & AU 2002335168 A	1-21
Y	大島泰郎, タンパク質の耐熱設計, 化学工業, vol. 38, no. 3, p. 223-226, 1987	1-21
Y	JP 2003-189878 A(武田薬品工業株式会社)2003.07.08 & DE 19923966 A & WO 00/71747 A & AU 200036591 A & EP 1185704 A & CZ 200104210 A & CN 1413262 A	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.08.2004

国際調査報告の発送日

14.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

宮澤 浩

2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 22, 23 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲 23 に係る発明は、アミノ酸残基の数、システイン残基の数を限定しても、膨大な数のタンパク質が含まれる。標的物質が特定されておらず、結合定数が変化する合成タンパク質に含まれる物の外縁が不明である。請求項 22 に係る発明はスクリーニング方法で限定しているが用いるmRNAが不明であり、その結果外縁が不明である。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1 - 22 に係る発明は、mRNA-ピューロマイシンを翻訳して得られるタンパク質連結体と標的物質との相互作用により有用タンパク質をスクリーニングする方法およびこのスクリーニング方法による得られるタンパク質に関する発明である。

一方請求の範囲 23 に係る発明は、アミノ酸残基数、システイン残基数が限定され、酸化還元により標的物質との結合定数が変化する合成タンパク質に関する発明である。
両者の間に、共通する単一の一般的発明概念が存在するとは認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。